

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 740**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2014 PCT/US2014/019558**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14137828**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014 E 14710750 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2962108**

54 Título: **Detección fluorescente in situ de apolipoproteínas de partículas lipídicas en la primera matraz electroforética**

30 Prioridad:

28.02.2013 US 201361770406 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.10.2018

73 Titular/es:

**HELENA LABORATORIES CORPORATION
(100.0%)
1530 Lindbergh Drive
Beaumont, TX 77707, US**

72 Inventor/es:

**GUADAGNO, PHILIP y
SUMMERS, ERIN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 686 740 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección fluorescente in situ de apolipoproteínas de partículas lipídicas en la primera matraz electroforética

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al campo de la electroforesis en gel, y en particular la detección *in situ* de partículas de lípidos dentro de una matriz electroforética.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La electroforesis es una técnica utilizada para separar especies cargadas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. En la electroforesis, las especies cargadas migran a través de un medio electroforético conductivo, que puede ser (pero no es obligatorio) un gel, bajo la influencia de un campo eléctrico. Los electrodos activados ubicados en cualquiera de los extremos del medio electroforético proporcionan la fuerza motriz para la migración. Las propiedades de las moléculas, incluidas su carga y masa, determinan lo rápido que el campo eléctrico hace que migren a través del medio electroforético.

[0003] Muchas moléculas biológicas importantes, tales como aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos, poseen grupos ionizables. Debido a estos grupos ionizables, a cualquier pH dado, existen muchas moléculas biológicas importantes en solución como especies cargadas eléctricamente. Las especies con carga eléctrica permiten a los médicos y científicos separar los ácidos nucleicos y las proteínas mediante electroforesis.

[0004] La separación de moléculas, biológicas o de otro modo, usando electroforesis depende de varias fuerzas, incluidas la carga y la masa. Cuando una muestra biológica, como una proteína o ADN, se mezcla en una solución tampón y se aplica a un medio electroforético, estas dos fuerzas actúan juntas. La separación mediante electroforesis es posible porque la velocidad de migración molecular a través del campo eléctrico depende de la intensidad del campo, la carga, el tamaño y la forma de las moléculas, y la fuerza iónica y la temperatura del tampón a través del cual se mueven las moléculas. Durante la electroforesis, el campo eléctrico aplicado hace que las moléculas se muevan a través de los poros del medio electroforético en función de la carga molecular. El potencial eléctrico en un electrodo repele las moléculas mientras que el potencial en el otro electrodo simultáneamente atrae las moléculas. La fuerza de fricción del medio electroforético también ayuda a separar las moléculas por tamaño. Normalmente, después de que se ha eliminado el campo eléctrico aplicado, las moléculas pueden mancharse. Después de la tinción, las macromoléculas separadas se pueden ver en una serie de bandas extendidas desde un extremo del medio electroforético al otro. Si estas bandas son suficientemente distintas, las moléculas en estas zonas pueden examinarse y estudiarse por separado fijando macromoléculas y lavando el medio electroforético para eliminar la solución tampón.

[0005] La separación de partículas de lipoproteínas en fluidos corporales (por ejemplo, suero o plasma) proporciona información sobre los niveles de diversas partículas de lipoproteínas. Varios estados de enfermedad se relacionan con niveles de apolipoproteínas y/o partículas de lipoproteínas que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer, hiperlipidemia, abetalipoproteinemia, hipotiroidismo, enfermedad hepática, diabetes mellitus y problemas renales. Los niveles más altos de partículas de apolipoproteína B y LDL se han asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Se ha descubierto que las diferencias en la cantidad de colesterol en una partícula también pueden jugar un papel en el riesgo de enfermedad cardiovascular. La LDL pequeña y densa, que contiene más colesterol, parece estar correlacionada con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, los niveles elevados de HDL se correlacionan con una disminución en el riesgo de enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, se necesitan predictores precisos del riesgo de un individuo de desarrollar diversas enfermedades relacionadas con las partículas de lipoproteínas con fines de investigación, diagnósticos y terapéuticos.

[0006] Tecnologías electroforéticas actuales para la detección de apolipoproteínas y las partículas de lipoproteínas no pueden identificar o discriminar la presencia de apolipoproteínas en múltiples partículas simultáneamente. Por lo tanto, existe la necesidad de un método más eficaz para detectar apolipoproteínas y partículas de lipoproteínas en una matriz electroforética.

[0007] Estrategias existentes para medir, detectar y cuantificar partículas de proteína de lípidos utilizan tinte no específico de proteínas para detectar las proteínas fijadas en un gel, lo que limita la especificidad en presencia de apolipoproteínas coincidentes sobre la partícula lipídica fija y la variedad de mediciones de diagnóstico posibles.

[0008] El documento WO2005/066373 desvela métodos y dispositivos que usan construcciones de sonda activas en Raman o activas en SERS para detectar analitos en muestras biológicas.

[0009] Hay una necesidad de un sistema de detección "in-situ" que puede afectar a todas las operaciones analíticas de manera eficiente dentro de la matriz electroforética zonal individual. Todos los demás sistemas asociados a la electroforesis requieren operaciones que incluyen, pero no se limitan a, la preparación de muestras de gel extra, la

reducción de proteína previa a la electroforesis/apolipoproteína y/o la desnaturalización, operaciones posteriores al electroforesis off-gel o de gel secundario. Un sistema y método que combina o evita dichos pasos tiene importantes beneficios económicos.

5 **[0010]** Esta invención está dirigida a superar estas y otras deficiencias en la técnica.

SUMARIO DE LA INVENCION

10 **[0011]** La invención se refiere a un método de electroforesis en gel zonal de evaluar el nivel de partículas de lipoproteínas específicas presentes en una muestra biológica que comprende: proporcionar un primer y un segundo complejo de unión de la lipoproteína, en donde el primer complejo de unión de lipoproteína, que comprende un anticuerpo que se une a una primera partícula de lipoproteína o porción de la misma, donde el anticuerpo está unido a una primera molécula fluorescente capaz de producir o causar la producción de una primera señal detectable y el segundo complejo de unión a lipoproteína comprende un segundo anticuerpo que se une a una segunda partícula de lipoproteína o una porción de la misma, en la que el segundo anticuerpo está unido a una segunda molécula fluorescente productora de señales capaz de producir o provocar la producción de una segunda señal detectable y en donde las señales primera y segunda detectables se pueden distinguir entre sí cuando se detectan en una única línea de un gel electroforético; separando las partículas de lipoproteínas presentes en la muestra biológica depositando la muestra biológica en un gel electroforético y llevando a cabo la electroforesis en gel; sondear las partículas de lipoproteínas o porciones de las mismas en el gel sometido a electroforesis con complejos primero y segundo de unión a lipoproteínas para producir las señales primera y segunda detectables; detectar las señales primera y segunda detectables producidas en el gel electroforético, en donde las señales detectables son detectables por medios fluométricos; y determinar el nivel de las partículas o porciones primera y segunda de lipoproteínas presentes en la muestra biológica en base a dicha detección.

25 **[0012]** La tecnología electroforética previa requería protocolos de transferencia o tinción IFE no proteica específica de complejo sondado reticulado. Además, las estrategias existentes para la medir, detectar y cuantificar partículas de proteína lipídica usan el tinte proteico no específico para detectar las proteínas fijas en un gel (Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2012/00525 94), lo que limita la especificidad en presencia de apolipoproteínas coincidentes en la partícula lipídica fija y la variedad de medidas diagnósticas posibles. Esta invención proporciona métodos más eficientes para detectar y cuantificar las apolipoproteínas y las partículas de lipoproteínas que evitan el uso de la tecnología de transferencia.

30 **[0013]** Para llevar a cabo la invención, anticuerpos primarios y/o secundarios etiquetados fluorescentemente se utilizan en conjunto con técnicas de electroforesis de lipoproteínas convencionales e instrumentación. Las etiquetas de anticuerpos fluorescentes en solución pueden entrar en contacto físico con la muestra antes de que la muestra se aplique al gel, inmediatamente después de la aplicación de la muestra, durante la electroforesis ya que los anticuerpos pueden estar contenidos dentro de la matriz del gel o después de la electroforesis. El gel primario se puede lavar, y secar, y la señal se evalúa en el gel al que se aplicó la muestra (es decir, detección in situ).

35 **[0014]** Este tipo de integración de anticuerpos fluorescentes con electroforesis en gel único convencional es único. La electroforesis mide la composición de las partículas lipídicas (lípidos centrales, lípidos de la membrana y apolipoproteínas), simultáneamente con todas las partículas lipídicas. Los métodos directos solo pueden dirigirse a un componente específico en una partícula específica con técnicas adicionales de separación de partículas no reversibles. Es decir, para obtener la composición intrapartícula, los métodos directos primero deben separar ciertas partículas y luego sondear las partículas restantes para el componente de interés. A menudo, las técnicas de separación son un compromiso de partículas y un análisis cuantitativo de límites en particular. La composición dinámica de interpartículas o intrapartículas no es posible con métodos directos, ya que dichos métodos miden objetivos específicos después de la exclusión (p. ej., precipitación, bloqueo de tensioactivo, etc.) directamente. Las antiguas etiquetas de proteínas fluorescentes de anticuerpos utilizadas con métodos directos no podían identificar ni discriminar la presencia de apolipoproteínas en múltiples partículas simultáneamente. Por lo tanto, la invención proporciona ventajas significativas sobre la tecnología anterior. Una ventaja significativa se relaciona con los anticuerpos múltiples que pueden combinarse, cada uno acoplado a diferentes informadores, para sondear la misma muestra electroforosa (por ejemplo, en un solo carril electroforético) para múltiples apolipoproteínas y/o partículas de lipoproteínas. Dicha detección in situ no tiene precedentes en la electroforesis en gel zonal que proporciona, entre otras ventajas, ahorros de tiempo, mano de obra y costes significativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60 **[0015]**

FIG. 1 es una ilustración esquemática de un gel después de la electroforesis de inmunofijación de lipoproteína no específica ("Lipo-IFE").

FIG. 2 es una ilustración esquemática de un gel después de Lipo-IFE con cola específica.

65 FIGS. 3A-3C son tres imágenes de un único gel de agarosa que presenta la técnica de detección integrada con cóctel de anticuerpos múltiples aplicado a un gel electroforético de múltiples muestras de pacientes. Brevemente,

se aplicaron cinco muestras de pacientes a un gel preparado por triplicado. Las cinco muestras se distribuyen verticalmente y la aplicación de columna se repitió tres veces. Se usaron tintes Alexa 488 (emisiones verdes) para identificar partículas ligadas a Apo-B y se usaron tintes Alexa 647 (emisiones de color naranja) para identificar partículas unidas a Apo-CIII. FIG. 3C (abajo a la izquierda) es una imagen cruda de la emisión de Alexa 647 y la FIG. 3B (arriba a la derecha) es una imagen cruda de la emisión Alexa 488 tomada del mismo gel a diferentes longitudes de onda. FIG. 3A (arriba a la izquierda de la imagen) se procesa para que el usuario visualice las imágenes combinadas en diferentes colores.

FIGS. 4A-4D son cuatro imágenes de un único gel de agarosa que presenta la técnica de detección integrada con un cóctel de anticuerpos trivalente aplicado a un gel electrofresado de múltiples muestras de pacientes. Brevemente, se aplicaron cinco muestras de pacientes a un gel preparado por triplicado. Las cinco muestras se distribuyen verticalmente y la aplicación de columna se repitió cuatro veces. Se usaron tintes Alexa 488 (emisiones azules) para identificar partículas unidas a Apo-B, se usaron tintes Alexa 647 (emisiones de color naranja) para identificar partículas ligadas a Apo-CIII y se usaron tintes Alexa 546 (emisiones verdes) para identificar partículas ligadas a Apo-E. FIG. 4C (abajo a la izquierda) es una imagen bruta de las emisiones Alexa 488 y Alexa 546, FIG. 4D) es una imagen cruda de las emisiones de Alexa 647, y la FIG. 4B (arriba a la derecha) es una imagen cruda de la emisión Alexa 488 tomada del mismo gel en diferentes longitudes de onda. FIG. 4A (imagen superior izquierda) se procesa para que el usuario visualice las imágenes combinadas trivalentes en diferentes colores.

FIGS. 5A-5C son exploraciones de densidad de la fila 1 del gel en las FIGS. 4A-4D para una muestra con un contenido quilomérico aumentado. Se ha demostrado que los quilomícrones contienen ApoB, ApoCIII y ApoE, y son neutros electrolíticamente en el gel alcalino utilizado en este experimento, generalmente aparece en el gel entre IDL y VLDL. La Figura 5A muestra los resultados para la fila 1, columna 1 (anti-ApoB) del gel de las FIGS. 4A-4C, que muestra picos dominantes cerca de las posiciones de LDL y VLDL. FIG. 5B muestra los resultados de la fila 1, carril 2 (anti-ApoCIII), que muestran picos dominantes cerca de la posición VLDL. FIG. 5C muestra los resultados para anti-ApoE, que muestra un pico dominante cerca de la posición VLDL.

FIGS. 6A-6C son exploraciones de densidad de la fila 2 del gel en las FIGS. 4A-4D para una muestra con mayor contenido de VLDL. Se sabe que las VLDL contienen ApoB, ApoCIII y ApoE. La FIG. 6A muestra los resultados para la fila 2, columna 1 (anti-ApoB) de la figura del gel, que muestra el pico dominante cerca de la posición VLDL. FIG. 6B muestra los resultados para la fila 2, carril 2 (anti-ApoCIII), que muestra un pico dominante cerca de la posición VLDL. FIG. 6C muestra los resultados para anti-ApoE, que muestra un pico dominante cerca de la posición VLDL.

FIGS. 7A-7C son exploraciones de densidad de la fila 3 del gel en las FIGS. 4A-4D para una muestra con contenido incrementado de IDL. Se sabe que los IDL contienen ApoB, ApoCIII y ApoE, la FIG. 7A es la fila 3, columna 1 (anti-ApoB) del gel, que muestra el pico dominante cerca de la posición IDL. FIG. 7B muestra los resultados para la fila 3, carril 2 (anti-ApoCIII) del gel, que muestra un pico dominante cerca de la posición VLDL. FIG. 7C muestra los resultados para anti-ApoE que muestra un pico dominante cerca de la posición de VLDL.

FIGS. 8A-8C son exploraciones de densidad de la fila 4 del gel en las FIGS. 4A-4D para una muestra con mayor contenido de HDL. Se sabe que los HDL contienen ApoCIII y ApoE. La FIG. 8A muestra los resultados para la fila 2, columna 1 (anti-ApoB) de la figura del gel, que muestra un pico dominante cerca de la posición de LDL (no se detectaría HDL con anti-ApoB). FIG. 8B muestra los resultados para la fila 4, carril 2 (anti-ApoCIII), que muestra los picos dominantes cerca de las posiciones Lp(a) y HDL. FIG. 8C muestra los resultados para anti-ApoE, que muestra picos dominantes cerca de las posiciones IDL y Lp(a).

FIGS. 9A-9C son exploraciones de densidad de la fila 5 del gel en las FIGS. 4A-4D para una muestra con contenido incrementado de IDL. Se sabe que los IDL contienen ApoB, ApoCIII y ApoE, la FIG. 7A muestra los resultados para la fila 3, columna 1 (anti-ApoB) de la figura del gel, que muestra un pico de IDL dominante. FIG. 7B muestra los resultados para la fila 3, carril 2 (anti-ApoCIII) que muestra un pico de VLDL dominante. FIG. 7C muestra los resultados para anti-ApoE que muestra un pico de VLDL dominante.

La FIG. 10 contiene la tabla completa de valores de densidad numérica por fila, carril y tipo de tinte, correspondiente a las FIGS. 4 a 9.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0016] Los aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

[0017] Los términos "partícula de lipoproteína", "partícula de proteína de lípidos", "partícula lipídica", y similares, como se usa en el presente documento se refiere a una partícula que contiene proteínas y lípidos. Los ejemplos de partículas de lipoproteínas se describen con más detalle a continuación.

[0018] El término "número de partículas de lipoproteínas" como se usa en el presente documento se refiere al número de las partículas de lipoproteínas presentes en el fluido corporal.

[0019] El término "apolipoproteína" tal como se utiliza aquí se refiere a una proteína que se combina con lípidos para formar una partícula de lipoproteína. Los ejemplos de tipos de apolipoproteínas se describen con más detalle a continuación. La naturaleza única de la apolipoproteína es su relación estequiométrica con las partículas de lipoproteínas, que proporciona una estimación del número de partículas de lipoproteínas, que se describe con más detalle a continuación.

5 **[0020]** Las muestras biológicas adecuadas o muestras biológicas de acuerdo con la invención incluyen matrices humanos biológicos, orina, plasma, suero y fracciones de lipoproteína humana. Por ejemplo, la muestra puede ser sangre fresca o sangre almacenada o fracciones de sangre. La muestra puede ser una muestra de sangre obtenida expresamente para los ensayos de esta invención o una muestra de sangre obtenida para otro fin que puede ser submuestreada para su uso de acuerdo con los métodos de acuerdo con la invención. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser sangre completa. Se puede obtener sangre completa del sujeto usando procedimientos clínicos estándar. La muestra biológica también puede ser plasma. El plasma se puede obtener a partir de muestras de sangre entera por centrifugación de sangre anticoagulada. La muestra biológica también puede ser suero. La muestra puede pretratarse según sea necesario por dilución en una solución tampón apropiada, concentrarse si se desea o fraccionarse por cualquier cantidad de métodos, que incluyen pero no se limitan a la ultracentrifugación, fraccionamiento por cromatografía líquida de rendimiento rápido (FPLC) o precipitación. Se puede usar cualquiera de varias soluciones tampón acuosas estándar, empleando una de una variedad de tampones, tales como fosfato, Tris o similares, a pH fisiológico a alcalino.

15 **[0021]** Como antecedentes, los ácidos grasos, colesterol, monoacilglicérols, y los ácidos biliares se absorben en el intestino. Los ácidos biliares se encuentran en la bilis intestinal y ayudan en la digestión de las grasas mediante la formación de micelas para emulsionar las grasas. Los ácidos biliares se almacenan en la vesícula biliar hasta que se secretan en el intestino después de comer. Las células epiteliales intestinales sintetizan triacilglicérols. Una porción del colesterol está esterificada para formar ésteres de colesterol. Las células intestinales forman quilomicrones a partir de triacilglicérols, ésteres de colesterol, fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas.

20 **[0022]** Partículas de lipoproteína específica o porciones de las mismas que pueden detectarse de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, la apolipoproteína A, apolipoproteína B, apolipoproteína C, apolipoproteína D, apolipoproteína E, apolipoproteína H, lipoproteína(a), lipoproteína de alta densidad, lipoproteína de densidad intermedia, lipoproteína de baja densidad, lipoproteína de muy baja densidad, quilomicrones, lipoproteína X, variantes oxidadas o mezclas de las mismas.

25 **[0023]** Las apolipoproteínas son el componente proteico de las partículas de lipoproteínas. Las apolipoproteínas recubren partículas de lipoproteínas que incluyen ésteres de colesterol y triacilglicéridos. La capa de la partícula de lipoproteína se compone de colesterol no esterificado, fosfolípidos y apolipoproteínas. La naturaleza única de la apolipoproteína es su relación estequiométrica con las partículas de lipoproteínas, que proporciona una estimación del número de partículas de lipoproteínas. Estas partículas de lipoproteína proporcionan una forma de hacer circular los componentes hidrofóbicos por todo el torrente sanguíneo. Las diferentes partículas de lipoproteínas incluyen quilomicro-P, VLDL-P, IDL-P, LDL-P, Lp(a)-P y HDL-P. Las partículas de lipoproteínas varían en tamaño, forma, densidad, composición de apolipoproteína y composición lipídica. Hay heterogeneidad dentro de cada clase y cada clase comparte características físicas similares. Al variar las condiciones, es posible visualizar diferentes partículas dentro de una clase. Hay mérito clínico al hacerlo porque, por ejemplo, una clase puede ser aterogénica y una clase puede ser ateroprotector.

30 **[0024]** La familia de apolipoproteína A (Apo A) constituye las principales proteínas encontradas en HDL-P y partículas de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Apo A, como parte de HDL, participa en la eliminación del colesterol libre de los tejidos extrahepáticos y también desempeña un papel en la activación de la aciltransferasa de lecitina. La apolipoproteína A activa las enzimas que conducen la transferencia de colesterol de los tejidos al HDL y también está involucrada en el reconocimiento de HDL y la unión de receptores en el hígado.

35 **[0025]** Existen múltiples formas de apolipoproteína A. Las formas más comunes son Apo A-I y Apo A-II. La apolipoproteína A (A-I, A-II y A-IV) se encuentran en quilomicrones y HDL. Apo A-I es la principal apolipoproteína A unida a HDL. Apo A-I es responsable de activar aciltransferasa de lecitina-colesterol y Apo A-II modula esa activación. La aciltransferasa de lecitina-colesterol convierte el colesterol libre en un éster de colesterol. Las secreciones de Apo A-IV aumentan cuando la grasa se absorbe en las intestinas. Apo A-IV también puede funcionar en la activación de la aciltransferasa de lecitina-colesterol.

40 **[0026]** La Apo A-I se encuentra en mayor proporción que Apo A-II (aproximadamente de 3 a 1). Los niveles más bajos de Apo A comúnmente se correlacionan con la presencia de enfermedad cardiovascular (ECV) y enfermedad vascular periférica. Apo A-I puede ser un mejor predictor de riesgo aterogénico que HDL-colesterol (HDL-C). Ciertos trastornos genéticos causan deficiencias de Apo A-I y niveles bajos asociados de partículas de HDL. Estos pacientes también tienden a tener hiperlipidemia con partículas de LDL elevadas. Esto contribuye a tasas aceleradas de aterosclerosis. Los niveles de Apo A pueden ser extremadamente bajos en la lipoproteinemia alfa (también conocida como deficiencia familiar de lipoproteínas de alta densidad).

45 **[0027]** El papel de las HDL y su principal apolipoproteína Apo A-I en la salida de colesterol de los macrófagos se ha estudiado ampliamente. Mientras que HDL compite por la unión de Apo AI, Apo A-I no es un competidor para la unión de HDL. Esta observación sugiere que HDL y Apo A-I se unen a macrófagos al menos en parte por receptores distintos. Por ejemplo, pre- β -HDL y Apo A-I libre de lípidos son ligamientos pobres para el receptor depurador (SR-BI), lo que explica la falta de competencia de la unión de HDL por la Apo AI. Por el contrario, se ha demostrado que la Apo A-I puede disociarse de la HDL, por lo que la Apo A-I libre de lípidos podría estar disponible para la

competencia del sitio de unión de Apo A-I por HDL. Lorenzi et al., "Apolipoprotein A-I but not high-density lipoproteins are internalised by RAW macrophages: roles of ATP-binding cassette transporter A1 and scavenger receptor". *BIJ Mol Med*. 86: 171-183 (2008). Apo A-II, otro componente de HDL, ha demostrado ser proaterogénico en modelos animales. Meyers et al., "Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection". *Curr Opin Cardiol*. 19 (4): 366 - 373 (2004).

[0028] La apolipoproteína B (Apo B-100 y Apo B-48) es el componente de proteína de LDL. Una molécula de Apo B está presente en la capa de fosfolípidos de cada LDL. Más del 90% de las partículas de LDL se componen de Apo B. La Apo B funciona para solubilizar el colesterol dentro del complejo de LDL, lo que a su vez aumenta la capacidad de transporte de LDL para el posterior depósito de colesterol LDL en la pared arterial. El depósito contribuye a la enfermedad cardiovascular. La Apo B es también un componente proteínico de los quilomigones, VLDL, IDL y Lp(a). Apo B es una gran glicoproteína helicoidal anfipática con 2 isoformas: Apo B-100 (sintetizada en los hepatocitos) y Apo B-48 (la proteína estructural de los quilomicrones). Los quilomicrones contienen Apo B-48, mientras que otras partículas de lipoproteínas que contienen Apo B contienen Apo B-100.

[0029] La Apo B modula la actividad de enzimas que actúan sobre partículas de lipoproteínas, mantiene la integridad estructural del complejo de partículas de lipoproteínas y facilita la absorción de partículas de lipoproteínas actuando como ligandos para receptores de superficie celular específicos. Las enzimas que actúan sobre las partículas de lipoproteínas incluyen, pero no se limitan a, lipasa de lipoproteína, aciltransferasa de lecitina-colesterol, lipasa de hepático-triglicérido y proteína de transferencia de éster de colesterol. Se encuentran niveles elevados de Apo B en la hiperlipoproteinemia. Apo B-100 está ausente en las formas de abetalipoproteinemia. Altos niveles de Apo B-100 pueden estar presentes en hiperlipoproteinemia, angina aguda e infarto de miocardio. Apo B-48 permanece en el intestino en la enfermedad de retención de quilomicrones.

[0030] Está bien establecido que la concentración de plasma aumentada de partículas de lipoproteína que contienen Apo B se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerótica. Los estudios de control de casos han encontrado que las concentraciones plasmáticas de Apo B son más discriminatorias que otros lípidos plasmáticos y partículas de lipoproteínas para identificar a pacientes con enfermedad coronaria (CHD). Véase De Backer et al., "European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice", *Eur Heart J* 24: 1601-1610 (2003); Walldius & Jungner, "Apolipoprotein B and Apolipoprotein A-I: Risk Indicators of Coronary Heart Disease and Targets for Lipid-modifying Therapy", *J Intern Med* 255 (2): 188-205 (2004); Walldius, et al., "The apoB/apoA-I ratio: A Strong, New Risk Factor for Cardiovascular Disease and a Target for Lipid-Lowering Therapy--A Review of the Evidence", *J Intern Med*. 259 (5): 493 - 519 (2006); Yusuf et al., "Effect of Potentially Modifiable Risk Factors Associated with Myocardial Infarction in 52 Countries (the INTERHEART Study): Case-control Study" *Lancet* 364: 937-52 (2004). La utilidad de Apo B para determinar el riesgo de CHD ha sido confirmada por estudios prospectivos, aunque la medida en que las concentraciones de Apo B fueron mejores que los lípidos séricos en la predicción del riesgo fue variable. Apo B es un componente de todas las partículas aterogénicas o potencialmente aterogénicas, incluidas las partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-P), partículas de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL-P), partículas de lipoproteína de baja densidad (LDL-P) y partículas de lipoproteína(a) (Lp(a)-P), y cada partícula contiene una molécula de Apo B. Por lo tanto, Apo B proporciona una medida directa de la cantidad de partículas de lipoproteínas aterogénicas en la circulación. La Apo B total no es homogénea. La Apo B total se verá influenciada por su presencia de Apo B en las diversas partículas anteriores. La medición de la Apo B total sola sin separar las partículas no indica con qué partícula se asocia.

[0031] Ahora hay un consenso claro que la Apo B es más fuerte predictora de enfermedad cardiovascular (ECV) que baja el colesterol de lipoproteínas de densidad (LDL-C) y un reciente informe de la conferencia de consenso de la American Diabetes Association (ADA) y el Colegio Americano de Cardiología (ACC) reconoce la importancia de la medición de Apo B (véase, Kannel et al., "Cholesterol in the Prediction of Atherosclerotic Disease", *Ann Intern Med* 90: 85-91 (1979) y Jeyarajah et al., "Lipoprotein Particle Analysis by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy," *Clin Lab Med* 26: 847-70 (2006). Un nivel elevado de Apo B y LDL-P significa que un individuo tiene un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. El nivel de Apo B y Lp(a)-P significa que un individuo tiene un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular.

[0032] Además, la relación Apo B/Apo A-I se ha demostrado estar fuertemente relacionada con el riesgo de infarto de miocardio (MI), accidente cerebrovascular y otras manifestaciones CV como se muestra en el riesgo de mortalidad relacionada con apolipoproteína (AMORIS) (Véase, Walldius & Jungner, "Apolipoprotein B and Apolipoprotein A-I: Risk Indicators of Coronary Heart Disease and Targets for Lipid-modifying Therapy", *J Intern Med* 255 (2): 188-205 (2004); Walldius, et al., "The apoB/apoA-I ratio: A Strong, New Risk Factor for Cardiovascular Disease and a Target for Lipid-Lowering Therapy--A Review of the Evidence," *J Intern Med*. 259 (5): 493-519 (2006); Walldius et al., "Stroke Mortality and the Apo B/Apo A-I Ratio: Results of the AMORIS Prospective Study". *J Intern Med*. 259: 259-66 (2006), e INTERHEART (Yusuf et al., "Effect of Potentially Modifiable Risk Factors Associated with Myocardial Inf- arction in 52 Countries (the INTERHEART Study): Case- control Study," *Lancet* 364: 937-52 (2004) y Yusuf et al., "Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study," *Lancet* 366: 1640-9 (2005)).

5 **[0033]** La apolipoproteína C (Apo C-I, C-II, C-III) es un componente de partículas de quilomión, partículas de VLDL, partículas de IDL y partículas de HDL. Apo C-II es un activador de lipasa de lipoproteína y una deficiencia produce una acumulación de quilomiónes y triacilgliceroles. Los niveles altos de Apo C-II son indicadores de angina e infarto de miocardio. La apolipoproteína C-II (Apo C-II) es un tipo específico de proteína que se encuentra en partículas grandes absorbidas del tracto gastrointestinal. También se encuentra en partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-P) que se compone principalmente de colesterol. Apo C-II es una apolipoproteína responsable de la activación de la lipasa de lipoproteína (LPL) en los capilares y así comienza el catabolismo de las partículas de quilomiónes y VLDL-P. También se encuentra en HDL-P. Los déficits de esta Apo C-II se presentan con hipertrigliceridemia grave e hiperquilomiónemia durante el ayuno.

10 **[0034]** Las mediciones de Apo C-II pueden ayudar a determinar el tipo específico o causa de lípidos sanguíneos altos (hiperlipidemia). Las personas con deficiencia de lipasa de lipoproteína familiar pueden tener grandes cantidades de Apo C-II. Otros trastornos que pueden estar asociados con altos niveles de Apo C-II incluyen la anorexia pectoris y el ataque cardíaco. Los niveles bajos de Apo C-II se observan en personas con una afección rara llamada deficiencia familiar de Apo C-II.

15 **[0035]** La apolipoproteína C-III (Apo C-III) se encuentra en partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-P). La apolipoproteína C-III es una proteína pequeña que también se encuentra en las partículas de LDL, quilomión y HDL. La Apo C-III inhibe la lipoproteína lipoproteica y la lipasa hepática y se cree que inhibe la captación hepática y retrasa el catabolismo de las partículas ricas en triglicéridos. Un aumento en los niveles de Apo C-III contribuye al desarrollo de hipertrigliceridemia.

[0036] Apo C-IV se encuentra en al menos VLDL-P y HDL-P.

25 **[0037]** Los genes Apo A-I, Apo C-III y Apo A-IV están estrechamente relacionados en genomas humanos y de ratas. Los genes A-I y A-IV se transcriben a partir de la misma cadena, mientras que los genes A-I y C-III se transcriben de forma convergente. Un aumento en los niveles de Apo C-III induce el desarrollo de hipertrigliceridemia.

30 **[0038]** La apolipoproteína D es un componente menor de HDL. Las altas concentraciones de Apo D se correlacionan con diversas enfermedades como la enfermedad quística grave de la mama y la enfermedad de Alzheimer.

35 **[0039]** La apolipoproteína E (Apo E-2, E-3 y E-4) se encuentran en quilomiónes e IDL. Apo E se une a un receptor en células hepáticas y periféricas. Apo E es esencial para el catabolismo normal de los constituyentes de las partículas de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Apo E fue inicialmente reconocida por su importancia en el metabolismo de las partículas de lipoproteínas y la enfermedad cardiovascular. Desempeña un papel en el transporte de lípidos a los tejidos, el transporte de colesterol desde los órganos al hígado, en el metabolismo de las partículas de lipoproteínas al eliminar VLDL y quilomiónes, y en la formación de lesiones ateroscleróticas. La porción Apo E de las partículas de lipoproteína media la unión de partículas de lipoproteína Apo E al receptor de LDL. La Apo E unida a HDL-P inhibe la agregación plaquetaria inducida por agonistas uniéndose a sitios en las plaquetas. Existen tres alelos diferentes del gen Apo E, Apo E e2, e3 y e4. Apo E e4 se asocia con un mayor riesgo de aparición tardía de la enfermedad de Alzheimer.

45 **[0040]** La apolipoproteína H funciona para unir cardiolipina. Los anticuerpos de anti-cardiolipina se encuentran en sífilis, esclerosis y lupus y en algunas enfermedades los anticuerpos requieren que la Apo H sea activa e inhibe la liberación de serotonina por las plaquetas y previene la agregación de plaquetas. Apo H también inhibe la liberación de serotonina por las plaquetas y evita la agregación de las plaquetas.

50 **[0041]** Los perfiles de lipoproteínas de partículas son diferentes para los diferentes individuos y para el mismo individuo en momentos diferentes. Los quilomiónes se producen en el intestino y transportan grasa digerida a los tejidos. La lipasa de lipoproteína hidroliza el triacilglicerol para formar ácidos grasos. Los quilomiónes son una de las partículas flotantes más grandes. VLDL se forma a partir de ácidos grasos libres sobre el metabolismo de quilomiónes en el hígado. La lipasa de lipoproteína hidroliza el triacilglicerol para formar ácidos grasos. IDL es el triacilglicerol no hidrolizado de VLDL. IDL se convierte en LDL debido a la lipasa hepática. El HDL juega un papel en la transferencia de colesterol al hígado desde los tejidos periféricos. HDL se sintetiza en el hígado y los intestinos.

55 **[0042]** Las partículas de LDL se unen a los receptores de LDL. Tras la unión del receptor, LDL se elimina de la sangre. Las células usan colesterol dentro del LDL para las membranas y la síntesis de hormonas. LDL deposita colesterol LDL en la pared arterial que contribuye a la enfermedad cardiovascular. LDL causa inflamación cuando se acumula dentro de una pared arterial. Los macrófagos se sienten atraídos por la inflamación y se convierten en células espumosas cuando toman LDL, causando inflamación adicional. Las LDL más pequeñas y más densas contienen más ésteres de colesterol que las LDL más grandes y flotantes.

65 **[0043]** La estructura de las partículas de lipoproteína(a) (Lp(a)-P) es la de una partícula de LDL con lipoproteína(a) unida a la apolipoproteína B por un enlace disulfuro. Las partículas de lipoproteína(a) parecen jugar un papel en la coagulación y pueden estimular a las células inmunes a depositar colesterol en las paredes de los conductos. Un

nivel alto de lipoproteína(a)-P indica un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, Lp(a)-P es útil en la evaluación de riesgos diagnósticos y estadísticos. Lp(a)-P puede servir para facilitar la deposición de placa de LDL-P. Los niveles de Lp(a)-P aumentan en eventos aterogénicos.

5 **[0044]** Lp(a)-P puede tener un vínculo entre la trombosis y la aterosclerosis, lo que interfiere con la función de plasminógeno en la cascada fibrinolítica. Numerosos estudios han documentado la relación de las altas concentraciones plasmáticas de Lp(a)-P con una variedad de trastornos cardiovasculares, que incluyen enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular y enfermedad coronaria prematura. Un gran estudio de estadounidenses mayores, en particular, demostró que los niveles elevados de Lp(a)-P predicen de forma independiente un mayor riesgo de accidente cerebrovascular, muerte por enfermedad vascular y muerte por todas las causas en los hombres (véase Fried et al., "The Carovascular Health Study: Design and Rationale", Ann. Epidemiol., 3: 263-76 (1991).

15 **[0045]** El colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) se ha usado para la medición para evaluar el riesgo cardiovascular. Sin embargo, debido a la variabilidad de LDL-C, Apo B es una mejor medida del número de partículas circulantes de LDL (LDL-P) y por lo tanto un indicador de riesgo más confiable que el LDL-C tradicional porque hay estequiometría 1:1 de partículas Apo B y LDL. La suma de Apo B total incluye, pero sin limitación, el complemento Apo B de LDL-P (partículas flotantes grandes y partículas densas pequeñas), + VLDL + IDL + Lp(a) + quilomicrones. La medición de los niveles de Apo B y las partículas de lipoproteínas asociadas proporciona información adicional sobre el riesgo de cardiopatía aterosclerótica más allá de las mediciones individuales o los ensayos tradicionales de LDL-C. La medición de los niveles de insulina en plasma en ayunas y el tamaño de las partículas de LDL también proporcionan información útil.

25 **[0046]** Variantes oxidadas de las lipoproteínas indicadas anteriormente también se pueden detectar. Las variantes oxidadas de lipoproteínas contribuyen a la aterogénesis, con oxidación que conduce a un aumento del calcio intracelular, disminución de la producción de energía, activación de citocinas, daño a la membrana, todo lo cual resulta en apoptosis, necrosis y finalmente muerte celular. La oxidación generalmente comienza cuando un radical reactivo separa un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado en la partícula LDL. Se forman radicales peroxilo y alcoxilo de lípidos, que a su vez pueden iniciar la oxidación en ácidos grasos vecinos, dando como resultado la propagación de la peroxidación de lípidos. Estas formas oxidadas de lipoproteínas son absorbidas por los macrófagos más rápidamente que las lipoproteínas nativas y esto da como resultado la acumulación de colesterol en los macrófagos y la subsiguiente formación de células espumosas e inhibición de la motilidad de los macrófagos tisulares y las células endoteliales. Esta cascada de eventos produce disfunción vascular y formación y activación de lesiones ateroscleróticas.

35 **[0047]** La electroforesis en gel puede ser unidimensional o bidimensional. El enfoque isoeléctrico también se puede realizar.

40 **[0048]** Sustratos de gel electroforético adecuados para uso con la invención son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los sustratos de gel adecuados incluyen, aunque sin limitación, agarosa o poli(acrilamida). Los geles SDS-PAGE (poliacrilamida) separan las proteínas en función de su tamaño porque la SDS recubre las proteínas con una carga negativa. La separación de proteínas en el gel de agarosa es por carga.

45 **[0049]** Geles electroforéticos de diferentes tamaños pueden contener diversos números de carriles (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, etc.). La muestra biológica de un solo individuo o sujeto puede sondearse para identificar múltiples componentes y/o se puede analizar el suero de múltiples individuos. Los protocolos para llevar a cabo la electroforesis en diferentes tamaños de geles serán similares, excepto que se pueden hacer modificaciones para optimizar la separación en ese tamaño de gel.

50 **[0050]** Como se señaló anteriormente, cada complejo incluye un anticuerpo que se une a una partícula de lipoproteína o una porción del mismo, donde el anticuerpo está unido a una molécula productora de señal en moles capaz de producir o provocar la producción de una señal detectable.

55 **[0051]** Tal como se utiliza aquí, se entiende que el término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes, así como porciones inmunoreactivas (es decir, porciones de unión a antígeno) de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos intracelulares, fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fv, Fab y F(ab)2), así como anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados (Ed Harlow y David Lane, USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); Houston et al., "Protein Engineering of Antibody Binding Sites: Recovery of Specific Activity in an Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced in Escherichia coli", Proc Natl Acad Sci EE.UU. 85: 5879-5883 (1988); Bird y col., "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242: 423-426 (1988)).

65 **[0052]** Los métodos para la producción de anticuerpos monoclonales se pueden llevar a cabo usando técnicas bien conocidas en la técnica (MONOCLONAL ANTIBODIES - PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATIONS (Mary A. Ritter y Heather M. Ladyman eds., 1995). Procedimientos para la generación de

anticuerpos policlonales también es bien conocida (Ed Harlow y David Lane, USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988).

5 [0053] Por ejemplo, los anticuerpos policlonales frente a una apolipoproteína pueden ser producidos por la inyección de un animal huésped adecuado, tal como un conejo, con la apolipoproteína de interés y un adyuvante. Se pueden inyectar aproximadamente 0,02 mililitros, y la reinyección ocurre cada 21 días hasta que se alcanza el título máximo de anticuerpos. El título del anticuerpo puede probarse, por ejemplo, mediante un sangrado de la oreja. De esta manera, se pueden producir anticuerpos contra Apo B-100 u otra apolipoproteína. Alternativamente, los anticuerpos para Apo B-100 u otra apolipoproteína se pueden comprar comercialmente.

10 [0054] Los anticuerpos pueden ser generados con altos niveles de especificidad, suficientes para distinguir diferentes isoformas de las mismas proteínas, tales como Lp(a) pequeño y Lp(a) grande. Tales anticuerpos se marcarían con, por ejemplo, sondas fluorescentes de diferentes colores y el tipo de apolipoproteína se puede distinguir con detalles extremos. Como se describe a continuación, los niveles absolutos y las proporciones de mediciones detalladas pueden informarse y convertirse en un factor de riesgo. Por ejemplo, la relación de Lp(a) pequeño a grande puede informarse con un límite específico para rangos de riesgo alto, medio y bajo.

15 [0055] Además de los anticuerpos completos, descritos son porciones de tales anticuerpos. Dichas partes de unión incluyen los fragmentos Fab monovalentes, fragmentos Fv (por ejemplo, anticuerpo monocatenario, scFv), dominios V_H y V_L únicos variables, y los fragmentos bivalentes $F(ab')_2$, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, minicuerpos, etc. Estos fragmentos de anticuerpos pueden prepararse por procedimientos convencionales, tales como los procedimientos de fragmentación proteolítica, como se describe en James Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE 98-118 (Academic Press, 1983) y Ed Harlow y David Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) u otros métodos conocidos en la técnica.

20 [0056] Moléculas productoras de señales adecuadas que son capaces de producir o provocar la producción de una señal detectable capaz serán conocidas por los expertos en la técnica. Las señales detectables aquí descritas incluyen cualquier señal adecuada para la detección y/o medición por medios radiométricos, colorimétricos, fluorométricos, de separación de tamaños o de precipitación u otros medios conocidos en la técnica.

25 [0057] Los ejemplos de moléculas productoras de señal que son capaces de producir o provocar la producción de una señal detectable incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones, e iones de metal paramagnético no radiactivo. Las moléculas que producen la señal se pueden acoplar o conjugar directamente al anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso como diagnósticos. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, diversas enzimas. Los ejemplos de enzimas incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; complejos de grupos protéticos tales como, entre otros, estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos de materiales fluorescentes incluyen, pero sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Los ejemplos de material luminiscente incluyen, pero no se limitan a, luminol. Los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen, pero no se limitan a, luciferasa, luciferina y aequorina. Los ejemplos de material radiactivo incluyen, pero no están limitados a, bismuto (^{213}Bi), carbono (^{14}C), cromo (^{51}Cr), (^{153}Gd , ^{159}Gd) 5 galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), germanio (^{68}Ge), holmio (^{166}Ho), indo (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), lantano (^{140}La), lutecio (^{177}Lu), manganeso (^{54}Mn), molibdeno (^{99}Mo), paladio (^{103}Pd), fósforo (^{32}P), praseodimio (^{142}Pr), prometio (^{149}Pm), renio (^{186}Re , ^{188}Re), rodio (^{105}Rh), rutemio (^{97}Ru), samario (^{153}Sm), scanidio (^{47}Sc), selenio (^{75}Se), estroncio (^{85}Sr), azufre (^{35}S), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), estaño (^{113}Sn , ^{117}Sn), tritio (^3H), xenón (^{133}Xe), iterbio (^{169}Yb , ^{175}Yb), itrio (^{90}Y), zinc (^{65}Zn). Otros ejemplos incluyen metales emisores de positrones que usan varias tomografías de emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

30 [0058] La detección de un complejo de molécula productora de señal de anticuerpo también se puede lograr mediante la adición de un reactivo capaz de interactuar con la molécula que produce señal, donde la molécula que produce la señal produce una señal detectable al entrar en contacto con el reactivo. Por ejemplo, la luz se emite cuando la luciferasa actúa sobre el sustrato de luciferina apropiado.

35 [0059] Un anticuerpo secundario que está acoplado a una señal detectable o un resto, tal como por ejemplo, una enzima (por ejemplo, luciferasa), fluoróforo, o cromóforo también se pueden utilizar.

40 [0060] Como se señaló anteriormente, cada señal detectable de los al menos dos complejos de unión de lipoproteínas es distinguible de la otra señal detectable. Esto permite el mezclado de al menos dos complejos de unión a lipoproteínas donde cada uno de los complejos detecta una partícula de lipoproteína diferente o una porción de la misma, produciendo cada complejo también o siendo capaz de producir una señal detectable diferente. Por ejemplo, un primer complejo de unión a lipoproteína puede incluir anticuerpo anti-Apo A1 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y un segundo complejo de unión a lipoproteína puede incluir anticuerpo anti-Apo A2 marcado

con rodamina. Los complejos primero y segundo pueden mezclarse o unirse entre sí y/o con complejos adicionales (por ejemplo, tercero, cuarto, quinto, sexto, etc.) que incluyen anticuerpos que pueden reconocer diferentes partículas de lipoproteínas o porciones de las mismas unidas a moléculas productoras de señales más distinguibles. Esto permite probar múltiples antígenos en un único carril electroforético.

[0061] La señal de la producción de moléculas utilizadas en el método de la invención incluyen etiquetas fluorescentes. El etiquetado fluorescente y la detección de fluorescencia natural en moléculas es un método de química analítica y biología que es bien conocido en la técnica. Los instrumentos utilizados para detectar la fluorescencia pueden incluir los siguientes componentes. Una fuente de luz con un amplio ancho de banda óptica, como una bombilla o un láser, se utiliza como fuente de luz estimulante. Se usa un filtro óptico para seleccionar la luz a la longitud de onda de estimulación deseada y transmitirla a la muestra. Los filtros ópticos están disponibles esencialmente en cualquier longitud de onda y se construyen típicamente mediante la deposición de capas de película delgada a una fracción de la longitud de onda de la longitud de onda de transmisión deseada. La luz que sale del filtro óptico se aplica luego a la muestra para estimular la molécula fluorescente.

[0062] La molécula entonces emite luz a su longitud de onda fluorescente característica. Esta luz se recoge mediante una lente adecuada y luego se pasa a través de un segundo filtro óptico centrado en la longitud de onda característica antes de ser llevada a un dispositivo de detección tal como un tubo fotomultiplicador, una célula fotoconductora o un detector óptico semiconductor. Por lo tanto, solo se detecta luz en la longitud de onda característica deseada para determinar la presencia de la molécula fluorescente. Por consiguiente, los al menos dos complejos de unión a lipoproteínas pueden incluir moléculas fluorescentes que emiten luz a longitudes de onda fluorescentes diferentes e identificables.

[0063] Etiquetas fluorescentes pueden ser multiplexadas en una sola área tal que son ópticamente distintas. Por ejemplo, se pueden aplicar 5 etiquetas fluorescentes diferentes, roja, verde, azul, amarilla y naranja a la misma área limitada y se pueden detectar y distinguir de forma independiente mediante un software de detección óptica. Por ejemplo, la línea de productos Life Technologies Alexa Fluor incluye al menos 19 tintes distintos que se pueden combinar para marcar anticuerpos distintos para marcar e identificar antígenos individuales. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos descritos en este documento, Alexa 647, Alexa 546 y Alexa 488 pueden combinarse para marcar anticuerpos distintos para marcar e identificar antígenos individuales (por ejemplo, Apo B, Apo C-III y Apo E). Se pueden incluir fluoróforos adicionales como Alexa 430 para optimizar un método y evitar la interferencia entre etiquetas. Un sistema óptico puede cuantificar las señales fluorescentes y normalizar automáticamente el valor de la señal para generar densidades relativas o números de partículas. Por ejemplo, al normalizar los coeficientes de extinción/emisión o la relividad cuántica de cada tinte, se pueden determinar los valores relativos para la concentración o el número de partículas.

[0064] El sistema y los métodos también pueden incluir un dispositivo o uso de un dispositivo para la detección de la señal detectable, en donde la detección indica el nivel de las apolipoproteínas específicas y/o partículas de lipoproteínas en la muestra biológica. El dispositivo también puede cuantificar el nivel de apolipoproteínas específicas y/o partículas de lipoproteínas basándose en la detección de la molécula que produce la señal.

[0065] La presencia de la partícula de lipoproteína o una porción de la misma en el gel electroforético puede entonces cuantificarse mediante la medición de la señal detectable o resto. El número de partícula se puede calcular luego de acuerdo con las relaciones estequiométricas conocidas (por ejemplo, la estequiometría 1:1 de partículas de Apo B y LDL). El número de partículas se puede cuantificar por comparación con un análisis separado que caracteriza la partícula lipídica total o la clase de concentración de partículas lipídicas en la muestra. Tal análisis por separado puede ser ultracentrifugación, RMN o cualquier otro método de análisis que pueda caracterizar una concentración o número total de partículas para partículas en la muestra. Dicha muestra utilizada en la electroforesis de partículas lipídicas y la cuantificación de partículas lipídicas pueden ser alícuotas diferentes de la misma muestra.

[0066] Se describe en la presente un método para evaluar el nivel de apolipoproteínas específicas y/o partículas de lipoproteínas presentes en una muestra biológica. Este método incluye las etapas de proporcionar una muestra biológica que comprende partículas de lipoproteína y proporcionar al menos dos complejos de unión a lipoproteínas. Cada complejo incluye un anticuerpo que se une a una partícula de lipoproteína o una porción de la misma, donde el anticuerpo se une a una molécula que produce señal capaz de producir o causar la producción de una señal detectable. Cada señal detectable de los al menos dos complejos de unión a lipoproteína se distingue de la otra señal detectable. Este método también incluye poner en contacto la muestra biológica con el anticuerpo en condiciones adecuadas para formar un complejo de molécula productora de lipoproteína-anticuerpo-síntesis y separar las partículas de lipoproteína presentes en la muestra biológica depositando la muestra biológica en un gel electroforético y llevando a cabo electroforesis de gel y puesta en contacto de la muestra biológica con el anticuerpo en condiciones adecuadas para formar un complejo de molécula productora de señal de anticuerpo de lipoproteína. El anticuerpo etiquetará la lipoproteína y fijará la lipoproteína en su lugar en el gel, lo que evitará la migración adicional durante los pasos de lavado posteriores. Este método incluye además la detección de la señal detectable producida por la molécula productora de señal del complejo de molécula productor de señal de antígeno-lipoproteína en el gel electroforético y determinar el nivel de la partícula específica de apolipoproteína y/o lipoproteína presente en la biológica basada en la detección.

[0067] Se describe en la presente un método para determinar si un sujeto tiene un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Este método incluye evaluar el nivel de apolipoproteínas y/o partículas de lipoproteínas específicas presentes en una muestra biológica. La evaluación incluye las etapas de proporcionar una muestra biológica que comprende partículas de lipoproteínas y proporcionar al menos dos complejos de unión a lipoproteínas. Cada complejo incluye un anticuerpo que se une a una partícula de lipoproteína o una porción de la misma, donde el anticuerpo se une a una molécula que produce señal capaz de producir o causar la producción de una señal detectable. Cada señal detectable de los al menos dos complejos de unión a lipoproteína se distingue de la otra señal detectable. La etapa de evaluación también incluye la separación de las partículas de lipoproteínas presentes en la muestra biológica depositando la muestra biológica en un gel electroforético y llevando a cabo la electroforesis en gel; poner en contacto la muestra biológica con los al menos dos complejos de unión a lipoproteínas en condiciones adecuadas para formar un complejo de molécula productora de señal de anticuerpo de lipoproteína; lavar el gel para eliminar, o eliminar sustancialmente, el anticuerpo no unido; detectar la señal detectable producida por la molécula productora de señal del complejo de molécula productora de señal de anticuerpo de lipoproteína en el gel electroforético; y determinar el nivel de la partícula específica de apolipoproteína y/o lipoproteína presente en la muestra biológica en base a la detección. El método también incluye la etapa de correlacionar el nivel determinado de la apolipoproteína y/o la partícula de lipoproteína con un control o valor de referencia para determinar si el sujeto tiene un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular.

[0068] La evaluación puede incluir la separación de partículas de lipoproteína presentes en la muestra biológica al depositar la muestra biológica en un gel electroforético y llevar a cabo electroforesis en gel; formar dos o más complejos de moléculas productoras de lipoproteína-anticuerpo-sígnal, donde los dos o más anticuerpos son específicos para dos o más partículas de lipoproteínas diferentes o una porción de las mismas; detectar la señal detectable producida por las moléculas productoras de señal de los respectivos complejos de molécula productora de señal de anticuerpo de lipoproteína en el gel electroforético; y determinar los niveles de las diferentes partículas de apolipoproteínas y/o lipoproteínas presentes en la muestra biológica en base a la detección.

[0069] La correlación en el contexto del riesgo para la salud relacionado con los lípidos, el estado cardiovascular y el riesgo de enfermedad cardiovascular se refiere a una correlación estadística de la distribución del tamaño de las lipoproteínas resultante con la mortalidad de la población y factores de riesgo, como es bien conocido en la técnica. La correlación en el contexto del monitoreo del riesgo cardiovascular (p. ej., para la respuesta a una intervención terapéutica) se refiere a la comparación de la distribución del tamaño de las lipoproteínas en dos momentos (p. ej., antes y después de una intervención terapéutica).

[0070] La correlación puede incluir la correlación de los niveles determinados de las distintas apolipoproteínas y/o partículas de lipoproteína a un valor de control o referencia para determinar si el sujeto está en un riesgo mayor de enfermedad cardiovascular.

[0071] La correlación también puede incluir la asignación de la sujeción a una categoría de riesgo seleccionada del grupo que consiste de grupos de alto riesgo, riesgo intermedio, y bajo riesgo (u óptimos). Existen recomendaciones bien establecidas para valores de corte para marcadores bioquímicos (por ejemplo, y sin limitación, niveles de colesterol y lipoproteínas) para determinar el riesgo (véase, BRAUNWALD'S HEART DISEASE: A TEXTBOOK OF CARDIOVASCULAR MEDICINE 9th ed. (Bonow et al. eds. 2011); "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)," JAMA 285 : 2486-2497 (2001); "Adult Treatment Panel III (ATP III) of the National Cholesterol Education Program. Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines," Circulation 110 (2): 227-39 (2004), y MedlinePlus, un servicio de la Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. y los Institutos Nacionales de Salud disponibles en nlm.nih.gov/medlineplus). Por ejemplo, la unión/detección anti-ApoB puede correlacionarse con estimaciones de corte para asignar una categoría de riesgo basada en Lp(a)-P y LDL-P. Por ejemplo, los valores de corte para asignar tales categorías de riesgo pueden ser los siguientes: Lp(a)-P: <75 nmol/L óptimo, 76-125 nmol/L de riesgo intermedio, >126nmol/L de alto riesgo; LDL-P: <1000 nmol/L óptimo, 1000-1299nmol/L de riesgo intermedio, >1300nmol/L de alto riesgo.

[0072] Las dos o más diferentes partículas o porciones de las lipoproteínas de las mismas pueden comprender al menos Apolipoproteína B y lipoproteína de baja densidad. Un nivel elevado de apolipoproteína B y partículas de lipoproteínas de baja densidad detectadas indica que un individuo tiene un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Dado que hay una estequiometría 1:1 entre ApoB y VLDL, una ApoB elevada se relaciona aritméticamente con VLDL-P.

[0073] Las diferentes partículas de lipoproteínas o porciones de las mismas pueden incluir, al menos, la apolipoproteína B y lipoproteína (a). Un nivel elevado de partículas de lipoproteína (a) indica que un individuo tiene un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular.

[0074] Las diferentes partículas de lipoproteínas o porciones de las mismas pueden incluir, al menos, la apolipoproteína B y la apolipoproteína C-III. Las diferentes partículas de lipoproteínas o porciones de las mismas pueden incluir al menos apolipoproteína B, apolipoproteína C-III, apolipoproteína E o combinaciones de las mismas.

[0075] La divulgación también incluye la capacidad para identificar relaciones de subclases de partículas lipídicas hasta ahora desconocidas y los niveles de relevancia, debido a la dificultad de distinción, medición y comparación. Todos los otros métodos de medición de partículas lipídicas hasta la fecha se han basado en el aislamiento de un tipo específico de partículas de lipoproteínas o apolipoproteínas. La apolipoproteína también suele aislarse de su partícula lipídica asociada mediante la reducción/desnaturalización de los reactivos. En estos métodos previos, se realizarían múltiples ensayos requeridos para incluir un control y todas las partículas o apolipoproteínas distintas. Por ejemplo, el método electroforético de inmunofijación de lipoproteínas no específico previo solo permite la investigación de un único tipo de proteína por ensayo, o carril en un gel, como ApoB o Apo A-I, pero no ambos. En el ensayo de electroforesis de inmunofijación de lipoproteínas de cola específica, un solo carril contendrá todos los componentes necesarios para evaluar las proporciones de partículas lipídicas o apolipoproteínas distintas.

[0076] La descripción también incluye un método para identificar rápidamente apolipoproteína clínicamente relevante de partículas lipídicas asociada(s), y ratios combinados. Se puede aplicar una solución de reactivo que combine múltiples anticuerpos marcados que se dirigen a diversos antígenos a cada separación de muestras biológicas en una población de muestra clínicamente relevante. Usando los métodos descritos en este documento, pueden calcularse múltiples relaciones de partículas marcadas y correlacionarse con los resultados de salud del paciente. Se pueden determinar las relaciones que se correlacionan con los resultados de salud específicos. Las proporciones pueden presentarse para acciones clínicas que comprenden la evaluación de diagnóstico, la evaluación de riesgos o la selección de un régimen de terapia basado en el riesgo de enfermedad cardiovascular determinada.

[0077] La divulgación también incluye la selección de un régimen de terapia basado en el riesgo de enfermedad cardiovascular determinado. Por ejemplo, se puede determinar que un individuo tenga un riesgo elevado según los métodos y luego se puede seleccionar un régimen de tratamiento en función del riesgo elevado.

[0078] El régimen de terapia seleccionado puede incluir medicamentos o suplementos. Los fármacos o suplementos adecuados incluyen los administrados con el fin de reducir el colesterol sérico, disminuir las LDL, IDL y VLDL, Lp(a) y/o elevar HDL, como se conoce en la técnica.

[0079] Los ejemplos de fármacos adecuados incluyen un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaca, un agente fibrinolítico, un agente reductor de lípidos, un inhibidor de trombina directa, un inhibidor de receptor de glucoproteína IIb/IIIa, un agente que se une a las moléculas de adhesión celular e inhibe la capacidad de los glóbulos blancos para unirse a tales moléculas, un bloqueador del canal de calcio, un bloqueador del receptor beta-adrenérgico, un inhibidor del sistema de angiotensina o combinaciones de los mismos.

[0080] El régimen de terapia seleccionado también puede implicar dar recomendaciones en la fabricación o el mantenimiento de opciones de estilo de vida basado en el riesgo de enfermedad cardiovascular determinado. Las elecciones de estilo de vida pueden incluir cambios en el cuerpo, cambios en el ejercicio, reducción o eliminación del hábito de fumar, o una combinación de ambos.

[0081] Un informe también puede ser generado que incluye, entre otras cosas, una descripción del régimen de tratamiento seleccionado. En algunas realizaciones, los resultados de los análisis de lipoproteínas se informan en dicho informe. Un informe se refiere en el contexto de las lipoproteínas y otros análisis de lípidos a un informe proporcionado, por ejemplo, a un paciente, a un médico, otro proveedor de atención médica, un epidemiólogo y similares, que incluye los resultados del análisis de un espectro biológico. por ejemplo, una muestra de plasma, de un individuo. Los informes pueden presentarse en forma impresa o electrónica, o en cualquier forma conveniente para el análisis, revisión y/o presentación de los datos, como se conoce en la técnica. Un informe puede incluir información de identificación sobre el sujeto individual del informe, que incluye, entre otros, nombre, dirección, sexo, información de identificación (por ejemplo, número de seguro social, números de seguro) y similares. Un informe puede incluir la caracterización bioquímica de los lípidos en la muestra, por ejemplo, sin limitación, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y/o colesterol HDL, y similares. Un informe puede incluir además la caracterización de lipoproteínas, y los intervalos de referencia, por lo tanto, realizados en muestras preparadas por los métodos proporcionados en este documento. El término "rango de referencia" y términos similares se refieren a las concentraciones de componentes de muestras biológicas conocidas en la técnica para reflejar los rangos normales observados típicos en una población de individuos. La caracterización ejemplar de lipoproteínas en un informe de análisis puede incluir la concentración y el intervalo de referencia para VLDL, IDL, Lp(a), LDL y HDL, y las subclases de los mismos. Un informe puede incluir además tendencias de distribución del tamaño de las lipoproteínas.

[0082] Se describe adicionalmente en este documento la administración del régimen de tratamiento seleccionado al sujeto. Por consiguiente, un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para tratar un sujeto que tiene un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular determinado.

[0083] La descripción también se refiere a un método de monitorear el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Este método incluye la determinación de si un sujeto tiene un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular en un primer momento y repetir la determinación en uno o más puntos de tiempo posteriores (p. ej., antes y después de la intervención terapéutica o en puntos de tiempo progresivos durante una intervención

terapéutica). El riesgo determinado en cada punto de tiempo progresivo se compara con el riesgo determinado de uno o más puntos de tiempo anteriores para evaluar si el riesgo del sujeto de desarrollar una enfermedad cardiovascular ha aumentado o disminuido, con lo que se controla el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Este método puede implicar asignar una categoría de riesgo basada en el riesgo determinado para desarrollar enfermedad cardiovascular y comparar las categorías de riesgo asignadas en puntos de tiempo progresivos (p. ej., comparar una primera categoría de riesgo determinada en un primer punto de tiempo con una segunda categoría de riesgo tomada en un segundo punto), monitoreando así el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular.

[0084] Como se señaló anteriormente, las tecnologías electroforéticas anteriores requirieron protocolos de transferencia o tinción no específica a proteínas tradicionales IFE de complejo palpado reticulado. Además, las estrategias existentes para medir, detectar y cuantificar las partículas de proteína lipídica usan un tinte de proteína no específico para detectar las proteínas fijadas en un gel (Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 2012/00525 94).

[0085] Esta invención proporciona métodos más eficientes para detectar y cuantificar las apolipoproteínas y las lipoproteínas de partículas que evitan el uso de la tecnología de transferencia.

[0086] Un ejemplo de un método de laboratorio de un método Lipo-IFE no específico incluye: 1) obtener una muestra biológica, 2) preparar la biosecuencia para incluir solo el suero, 3) aplicar la biosmuestra al gel, 4) separar las partículas de lípidos por electroforesis, 5) aplicar anticuerpos policlonales al gel para fijar la ApoB, 6) lavar el gel para que se deshaga de cualquier cosa que no sea una partícula lipídica unida a un complejo Anticuerpo-ApoB, 7) teñir el gel con una tinción de proteína no específica, 11) repetir el proceso en paralelo para varios objetivos inmunológicamente activos tales como Apo A-I, Apo A-II, Apo E2, Apo E3 y Apo E4 en carriles independientes. La Figura 1 muestra una representación de un gel de electroforesis de inmunofijación de lipoproteína no específica final para la identificación de diversas partículas de lipoproteína. Antes del procedimiento de inmunofijación, se preparan biomuestras (en este caso muestras de suero) según sea necesario para separar las partículas de lípidos intactas mediante electroforesis en gel. Cada carril, en la figura etiquetada como columnas ApoB, Apo A-I y Apo A-II, recibe porciones de la misma muestra de suero del paciente. Los componentes nativos (no desnaturalizados o modificados) de la muestra están separados por electroforesis. Su separación se efectúa de acuerdo con la carga y el tamaño.

[0087] Para cada carril, un antisuero dirigido a una apolipoproteína distinta sobre una partícula de lipoproteína se aplica al gel de la fijación del complejo de lipoproteínas/lípido de partículas en el lugar en el carril y cualquier proteína adicional asociada con la partícula. El gel se lava para eliminar los materiales no inmunizados y se aplica al gel una tinción de proteína no específica. Se puede realizar un análisis posterior para informar cantidades relativas de lipoproteínas en un carril, todas las cuales están asociadas con la misma apolipoproteína. El proceso se repite en carriles adicionales con antisueros contra diferentes apolipoproteínas pero usando la misma tinción proteica no específica. La inmunofijación y la tinción se llevan a cabo en el mismo gel que el procedimiento de electroforesis.

[0088] Los antisueros están compuestos de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos a una apolipoproteína específica tal como existe en la superficie de una partícula de lipoproteína. Debido a que el análisis posterior no es específico, el antisuero solo puede dirigirse a un solo antígeno. El análisis se limita a niveles relativos de partículas que tienen la misma apolipoproteína unida a la proteína. Un ejemplo de un método de análisis de un Lipo-IFE no específico incluye: 1) diferenciar las bandas detectadas en un carril de gel determinando manualmente o automáticamente los límites alrededor de cada banda, 2) asociando cada banda con distintos lípidos unidos a ApoB, 3) asignación de bandas a diferentes partículas, 4) obtención de un número de concentración total para partículas lipídicas unidas a ApoB a partir de un ensayo diferente tal como ultracentrifugación o RMN, 5) cálculo de los números de partículas basados en densidad óptica y posición en el gel y número absoluto de partículas, 6) evaluar el nivel de riesgo del paciente para enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus o cualquier otra condición por nivel de partículas informadas absolutas, y/o 7) calcular una proporción de los niveles de partículas con significación clínica y la evaluación del nivel de riesgo del paciente para la enfermedad cardiovascular, la diabetes mellitus o cualquier otra condición por las relaciones de nivel de partículas, y 8) informar dicho nivel de riesgo.

[0089] Por otro lado, un ejemplo de un método de la invención que utiliza Lipo-IFE específico incluye: 1) obtención de una muestra biológica, 2) preparación de la bio-muestra para incluir solo suero, 3) aplicación de la bio-expresión al gel, 4) separación de proteínas-lípidos por electroforesis, 5) aplicación de anticuerpos policlonales marcados fluorescentemente para que el gel se una a una multiplicidad de restos de apolipoproteína en las lipopartículas en la línea del gel, 6) lavado del gel para eliminar todo lo que no sea un complejo lipopartícula-anticuerpo 7) detección de todas las lipopartículas asociadas con una etiqueta fluorescente diferente en diferentes bandas del gel 9) asignación de señales fluorescentes distintas a diferentes apolipoproteínas en partículas de lípidos 10) obtención de un número de concentración total para partículas lipídicas de un ensayo diferente tal como ultracentrifugación o RMN, 11) calcular los números de partículas basándose en alguna combinación de densidad óptica/coeficientes de emisión, longitud de onda de la señal fluorescente, posición en el gel y número absoluto de partículas. Además, en un método de diagnóstico, se puede calcular una relación de apopartículas detectadas en el ejemplo anterior tal como ApoB/ApoAI, y evaluar el riesgo de CHD basándose en la relación calculada.

[0090] La Figura 2 es una representación de un ejemplo de gel de electroforesis de inmunofijación de lipoproteínas específicas finales, aplicado con anticuerpos etiquetados individualmente con cola. Antes del procedimiento de inmunofijación, se preparan biomuestras (en este caso muestras de suero) según sea necesario para separar las partículas de lípidos intactas mediante electroforesis en gel. Alícuotas idénticas de una sola muestra de paciente se aplican a diferentes carriles en el gel, o se aplican diferentes muestras de pacientes a cada carril de gel. La Figura 2 es una representación de alícuotas idénticas de una sola muestra de paciente para lograr un análisis diferente. La separación se efectúa por electroforesis en gel zonal de acuerdo con la carga y el tamaño.

[0091] Como se describió anteriormente, se hacen varios cócteles de antisueros multiplexados para su aplicación a un carril. Por ejemplo, los antisueros en la línea 1 comprenden anticuerpos anti-ApoB marcados con una etiqueta fluorescente roja, anticuerpos anti-Apo A-I marcados con una etiqueta fluorescente verde y anticuerpos anti-Apo A-II marcados con una etiqueta fluorescente naranja. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. La inmunofunción y la tinción se llevan a cabo en el mismo gel que el procedimiento de electroforesis. Después de la aplicación del antisuero a un carril, el gel puede ser transferido para eliminar antisueros en exceso, lavarse para eliminar el exceso de anticuerpos etiquetados y materiales no inmunofijados coincidentes, borrarse de nuevo y secarse. El gel se aplica a un sistema de detección, en este ejemplo un sistema de detección de fluorescencia, para generar una visualización del gel final para un usuario y analizar las cantidades de cada partícula por número y tipo de etiqueta.

[0092] Los instrumentos de análisis pueden incluir Biorad ChemiDoc MP y Syngene G: BOX F3. El instrumento de análisis puede detectar la estrecha longitud de onda de una etiqueta fluorescente en cada anticuerpo para distinguir las bandas superpuestas.

[0093] Los diferentes colores pueden aparecer en la banda aproximada o exacta en un carril de gel, porque algunas partículas lipídicas contienen más de una apolipoproteína, a la que los anticuerpos distintos están dirigidos, aunque sus características de separación como carga y tamaño de partícula son similares. En este ejemplo, un sistema de detección detectará por separado la longitud de onda fluorescente a través de una variedad de medios posibles que incluyen detección de ancho de banda estrecho y/o longitudes de onda de excitación diferentes.

[0094] El sistema de detección también puede ajustar la señal de salida que se normalizó con la salida de otras señales del mismo carril por variables tales como coeficientes de extinción/emisión y la fuerza de transmisión, para volver a precisión las concentraciones relativas y absolutas de puerto de las lipopartículas separadas y apolipoproteínas.

EJEMPLOS

[0095] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones de la presente invención pero de ningún modo pretenden limitar su alcance.

Ejemplo 1: Detección *in situ* de Apo-B y Apo-CIII

[0096] FIGS. 3A-3C muestran un ejemplo de la técnica de detección integrada con cóctel de anticuerpos múltiples aplicado a un gel electroformado de múltiples muestras de pacientes. En particular, se aplicaron cinco muestras de pacientes a un gel preparado por triplicado. Las cinco muestras se distribuyen verticalmente y la aplicación de columna se repitió tres veces. Se usaron tintes Alexa 488 (emisiones verdes) para identificar partículas unidas a Apo-B y se usaron tintes Alexa 647 (emisiones angelicales) para identificar partículas unidas a Apo-CIII. Los materiales y métodos empleados se describen con más detalle a continuación.

[0097] Las muestras de los pacientes se sometieron a electroforesis, separando las lipoproteínas en cada carril como se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2012/0052594. Se sustituyó el agua DI por el lavado/rehidratación TBS del gel después de la electroforesis y una inmunofijación. En general, se usó un Sistema de Electroforesis SPIFE de Helena Laboratories Corporation para analizar muestras de suero de varios pacientes. Las muestras de pacientes se pipetearon en copas de muestra en una matriz que corresponde a las pistas en el gel. Un conjunto de aplicador contactó con las muestras del paciente para adsorber la muestra y transferirla a la superficie del gel de agarosa. Los electrodos se conectaron a extremos opuestos en los bloques de gel y se aplicaron tensiones para instigar la migración electroforética.

[0098] Los electrodos se retiraron después de la electroforesis y los bloques de gel fueron retirados y descartados. Antisuero Apo-B conjugado al tinte fluorescente Alexa 488 se aplicó a la línea 1. El antisuero Apo-CIII se conjugó con tinte fluorescente Alex 647 a la línea 3. Se aplicó una combinación de Apo-B y antisuero Apo-CIII a la línea 2. El exceso de antisuero se lavó del gel y el gel se secó.

[0099] El gel secado se analizó en un sistema de imágenes Bio-Rad Chemidoc MP con excitación secuencial y de formación de imágenes de tintes Alexa 488 y Alexa 647. Las imágenes del gel se muestran en las FIGS. 3A-3C. La parte inferior izquierda (Fig. 3C) es una imagen cruda de la emisión Alexa 647 y la esquina superior derecha (Fig. 3B) es una imagen cruda de la emisión Alexa 488 tomada del mismo gel a diferentes longitudes de onda. La imagen

superior izquierda (Fig. 3A) se procesa para que el usuario visualice las imágenes de combinación en diferentes colores. Las imágenes subsiguientes pueden analizarse adicionalmente para determinar la intensidad de banda para cuantificar las concentraciones de lipopartículas.

5 **[0100]** Como se señaló anteriormente, el panel en la parte inferior izquierda (Fig. 3C) muestra la fluorescencia de los Alexa 647 colorantes conjugados con anticuerpos Apo-CIII. Apo-CIII es especialmente frecuente en VLDL y las partículas de HDL, y se muestra con mayor intensidad en aquellas bandas en los carriles 2 y 3.

10 **[0101]** Como también se ha indicado anteriormente, el panel de la parte superior derecha (Fig. 3B) muestra la fluorescencia de tintes Alexa 488 conjugados con anticuerpos Apo-B. La Apo-B se encuentra en las partículas LDL, VLDL y Lp(a).

15 **[0102]** Un análisis computarizado puede procesar las imágenes en la esquina superior derecha (Fig. 3B) e inferior izquierda (Fig. 3C) para cuantificar las concentraciones de lipopartículas en un único gel. La imagen superior izquierda (Fig. 3A) presenta el resultado de la imagen compuesta de ambas sondas IFE anti-apoB y anti-apoCIII, es decir, una imagen superpuesta de sondas de anticuerpos bivalentes codificadas por colores para ApoB ligada y APO-CIII vinculada en sus respectivas partículas de lípidos. La técnica de combinación múltiple de anticuerpos permite la cuantificación simultánea e independiente de anticuerpos en la misma muestra en el mismo gel.

20 **[0103]** Las muestras elegidas para el análisis representan pacientes con elevaciones independientes de VLDL y HDL en presencia de elevaciones de LDL y Lp(a)-P. El análisis de tales muestras demuestra la capacidad de los métodos descritos en este documento para discriminar la presencia relativa de apolipoproteína en las respectivas partículas de lípidos.

25 **[0104]** Las dos muestras superiores demuestran la capacidad de los métodos descritos en este documento para determinar a apolipoproteínas sondeadas en VLDL elevada en presencia de LDL, Lp(a) con contribución mínima HDL. Las dos muestras inferiores demuestran la capacidad de los métodos descritos aquí para determinar las apolipoproteínas sondeadas en HDL elevado en presencia de Lp(a) elevada con una contribución mínima de VLDL. La muestra central demuestra la capacidad de los métodos descritos en este documento para determinar apolipoproteínas sondeadas en elevaciones modestas de LDL, VLDL y HDL.

30 **[0105]** Como se muestra en las FIGS. 3A-3C, las tres muestras inferiores indican niveles altos de LDL (que se indica por la presencia detectada de Apo-B) y HDL (que se indica por la presencia detectada de Apo-CIII) sin VLDL (que se indica por falta de Apo-CIII cerca de la posición de LDL). La tercera muestra de la parte superior muestra altos niveles de LDL unida a Apo-B y HDL ligada a Apo-CIII. La segunda muestra de la parte inferior muestra LDL y Lp(a) ligados a Apo-B. La muestra inferior muestra LDL ligada a Apo-B, algo de HDL ligada a Apo-CIII y traza Lp(a) ligada a Apo-B.

40 **Ejemplo 2: Detección *in situ* de Apo-B, Apo-CIII y ApoE**

45 **[0106]** En un segundo experimento, sondas de anticuerpos de fluorescencia monovalentes y trivalentes se prepararon y se mostró con éxito que sondearan apolipoproteínas en partículas de lípidos intactas separadas por electroforesis en una sola matriz de gel. Se prepararon muestras de pacientes con perfiles de lipopartículas conocidos y se aplicaron a geles para separación y análisis según los mismos protocolos que en el Ejemplo 1. Las composiciones de lipopartículas conocidas incluyeron aquellas con mayor contenido de quilomicrones, mayor contenido de VLDL, mayor contenido de LDL, dos con mayor contenido de IDL y aumento en el contenido de HDL. Después de la separación, los carriles se sondearon con anti-ApoB conjugado con Alexa 488, anti-ApoC-III, conjugado con Alexa 647, y anti-ApoE conjugado con Alexa 546, de forma independiente (con sondas monovalentes) y colectivamente (las sondas trivalentes). Los geles de lipoproteínas marcadas resultantes se expusieron a imágenes de fluorescencia y se registraron los picos. Las imágenes de gel en bruto se presentan en las FIGS. 4A-4D.

50 **[0107]** En este experimento, anti-ApoB conjugado con reactivos AI-EXA 488 fueron optimizados para ser capaces de generar resultados cuantitativos. Anti-ApoCIII (conjugado con Alexa 647) y anti-ApoE (conjugado con Alexa 546) no se optimizaron y muestran solo resultados cualitativos, por lo que solo las indicaciones de la presencia de lipopartículas se concluyen con dichas sondas.

55 **[0108]** La obtención de imágenes por escáner de fluorescencia usando un Bio-Rad ChemiDoc MP permite el análisis cuantitativo relativo de las apolipoproteínas de partículas lipídicas intactas separadas electroforéticamente al (a) importar una concentración total de apolipoproteína con el análisis de área relativa bajo curva para habilitar las concentraciones de apolipoproteína molar "en tándem" o (b) los calibradores internos (*in situ*), con el análisis relativo de área bajo curva, permitirán las concentraciones de apolipoproteína molar independientes en gel. Cualquiera de los métodos es practicado rutinariamente por los expertos en la técnica.

60 **[0109]** El sistema presentado muestra separación de cinco clases de partículas de lipoproteínas por electroforesis y cada una se sondeó con tres anticuerpos específicos para producir quince análisis simultáneos en una sola muestra

de suero. Se realizaron cinco exploraciones de muestra en el gel en las FIGS. 4A-4D y densitometría se muestran en las FIGS. 5 a 10, de la siguiente manera:

5 **[0110]** FIGS. 5A-5C: Muestra 1, suero con quilomicrones elevados. Los quilomicrones son eléctricamente neutros en este protocolo y no están etiquetados en la figura debido a la mayor varianza sobre las partículas no neutras. El análisis por gel electroforético puede estar respaldado por la turbidez observada visualmente y las comparaciones entre muestras de plasma antes y después de los quilomicrones se eliminan por centrifugación. Se sabe que ApoE es una parte de los quilomicrones, pero la evidencia indica que la concentración es menor que otros tipos de partículas, como las VLDL.

10 **[0111]** FIGS. 6A-6C: Muestra 2, suero con VLDL-P elevada. VLDL contiene Apo-B, Apo-CIII y Apo-E, por lo tanto los resultados muestran evidencia de las tres sondas en las figuras.

15 **[0112]** FIGS. 7A-7C: Muestra 3, suero con IDL-P elevada. Hay evidencia de contenido de IDL Apo-B a concentraciones más altas que cualquiera de Apo-CIII o Apo-E, a pesar de la presencia de las tres apolipoproteínas en IDL. El pico de Apo-B es más grande que sus contrapartes, y los picos Apo-CIII y Apo-E están presentes pero en niveles más bajos que la composición de partículas VLDL.

20 **[0113]** FIGS. 8A-8C: Muestra 4, suero con niveles elevados de HDL-P. La especificidad de los anticuerpos etiquetados confirma la presencia cualitativa de las apolipoproteínas dirigidas en sus respectivas partículas lipídicas. Aunque la sonda apoB arrojó los resultados esperados, la presencia provocadora de apoCIII y apoE en la región Lp(a) requiere mayor investigación. La naturaleza sin precedentes de esta tecnología proporciona información hasta ahora no disponible sobre la dinámica de equilibrio de la composición de partículas lipídicas. La especificidad sin precedentes del análisis del contenido de lipoproteínas por contenido de proteínas muestra los resultados esperados para el contenido de HDL-P apo-B (no se espera ninguno) y el contenido inesperado de apo-CIII y apo-E cerca de la posición Lp(a).

25 **[0114]** FIGS. 9A-9C: Muestra 5, un segundo suero con IDL-P elevada. Se esperan resultados para apo-B y apo-CIII, que muestren un alto contenido de apo-B correspondiente a las partículas de IDL elevadas y el contenido evidente de apo-CIII, proporcionalmente menor que el contenido de VLDL. El contenido de Apo-E es evidente en las partículas de IDL en 9C, con picos inesperados cerca de las posiciones de VLDL.

30 **[0115]** Aunque las realizaciones preferidas se han representado y descrito en detalle en el presente documento, será evidente para los expertos en la técnica relevante que diversas modificaciones, adiciones, sustituciones, y similares se pueden hacer dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones siguientes.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método de electroforesis en gel zonal para evaluar el nivel de partículas de lipoproteínas específicas presentes en una muestra biológica que comprende:

5 proporcionar un primer y un segundo complejo de unión a lipoproteínas, donde el primer complejo de unión a lipoproteínas comprende un anticuerpo que se une a una primera partícula de lipoproteína o parte de la misma, en la que el anticuerpo está unido a una primera molécula fluorescente que produce señal capaz de producir o causar la producción de una primera señal detectable y el segundo complejo de unión a lipoproteína comprende un segundo anticuerpo que se une a una segunda partícula de lipoproteína o una porción de la misma, en donde el segundo anticuerpo está unido a una segunda señal fluorescente produciendo una molécula capaz de producir o causar la producción de una segunda señal detectable y en la que la primera y segunda señal detectables son distinguibles entre sí cuando se detectan en una única línea de un gel electroforético; separando las partículas de lipoproteínas presentes en la muestra biológica depositando la muestra biológica en un gel electroforético y llevando a cabo la electroforesis en gel; sondeando las partículas o porciones de lipoproteínas de las mismas en el gel electroformado con el primer y segundo complejo de unión a lipoproteína para producir la primera y la segunda señal detectable; detectar la primera y la segunda señal detectable producidas en el gel electroforético, en donde las señales detectables son detectables por medios fluorométricos; y determinar el nivel de las partículas primera y la segunda o porciones de lipoproteínas presentes en la muestra biológica en base a dicha detección.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la primera y la segunda partícula de lipoproteína o porciones de la misma se seleccionan independientemente del grupo que consiste en apolipoproteína A, apolipoproteína B, apolipoproteína C, apolipoproteína D, apolipoproteína E, apolipoproteína H, lipoproteína (a), lipoproteína de alta densidad, lipoproteína de densidad intermedia, lipoproteína de baja densidad, lipoproteína de muy baja densidad, quilomicrones, lipoproteína X, variantes oxidadas y mezclas de las mismas.

3. El método según la reivindicación 2, en el que la primera partícula de lipoproteína o porción de la misma comprende la apolipoproteína B.

4. El método según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de determinación comprende: cuantificar el nivel de partículas de lipoproteína basándose en dicha detección.

5. El método según la reivindicación 2, en el que la segunda partícula de lipoproteína o parte de la misma comprende lipoproteína de baja densidad oxidada.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende adicionalmente: determinar la(s) relación(es) relativa(s) de partícula(s) de lipoproteína presente(s) en la muestra biológica en base a dicha cuantificación.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la apolipoproteína A comprende apolipoproteína A-I, apolipoproteína A-II o apolipoproteína A-IV.

8. El método según la reivindicación 2, en el que la apolipoproteína B comprende apolipoproteína B48 o apolipoproteína B100.

9. El método según la reivindicación 2, en el que la apolipoproteína C comprende apolipoproteína C-I, apolipoproteína C-II, apolipoproteína C-III o apolipoproteína C-IV.

10. El método según la reivindicación 2, en el que la apolipoproteína E comprende apolipoproteína E-2, apolipoproteína E-3 o apolipoproteína E-4.

55

60

65

GEL DE INMUNOFIJACIÓN DE LIPOPROTEÍNA

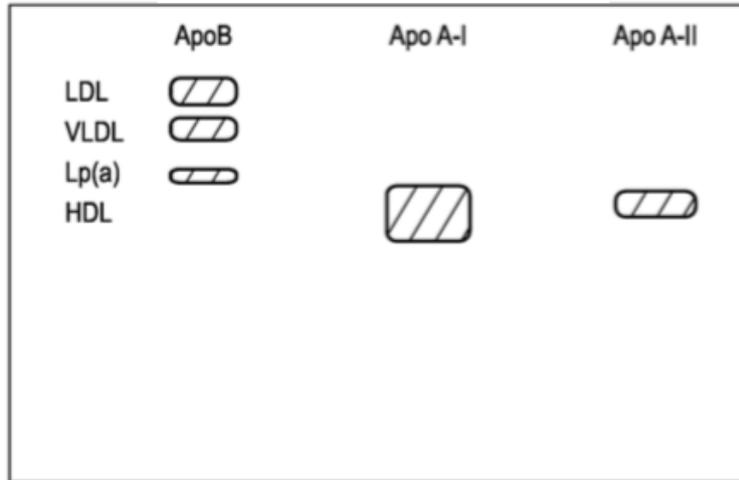


FIG. 1

GEL DE INMUNOFIJACIÓN DE LIPOPROTEÍNA

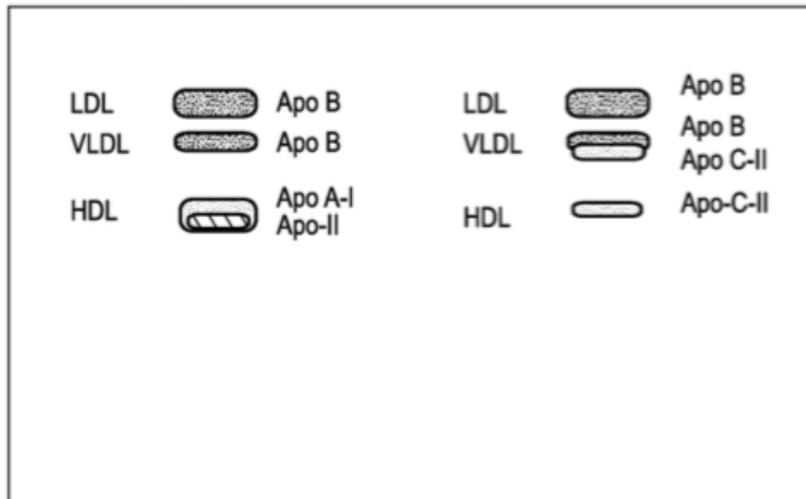
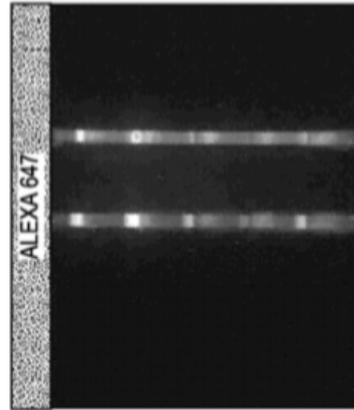
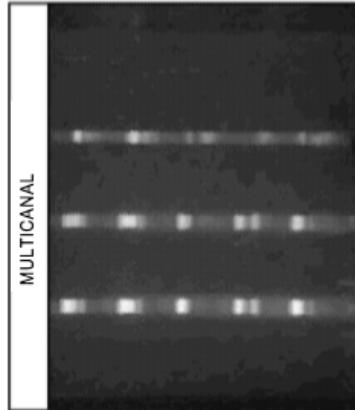
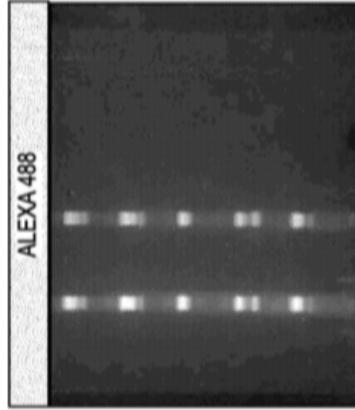


FIG. 2



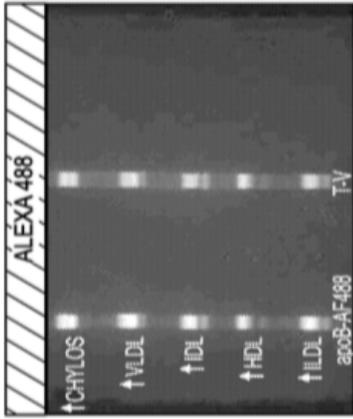


FIG. 4B

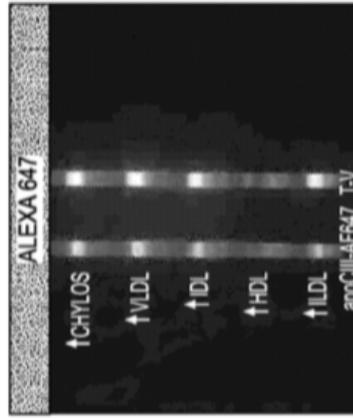


FIG. 4D

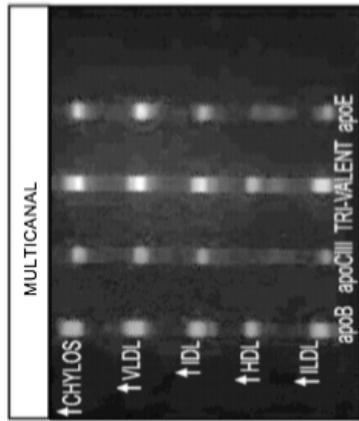


FIG. 4A

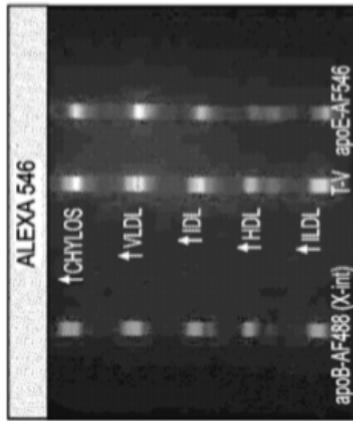
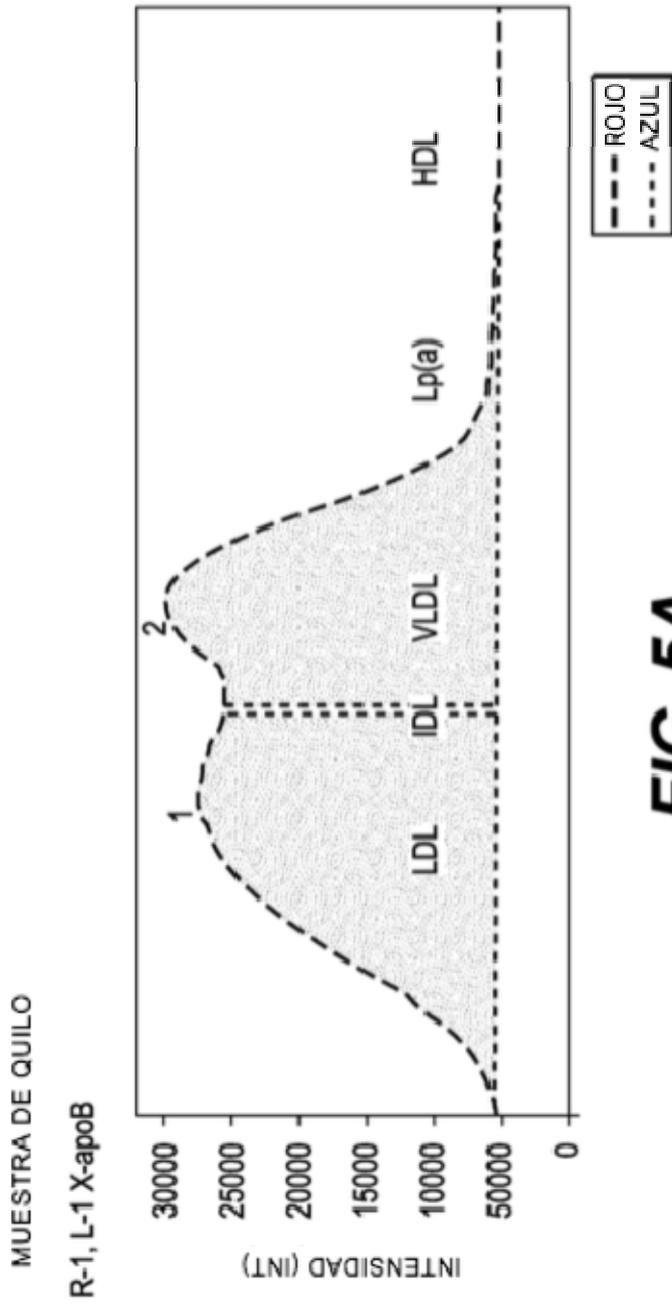
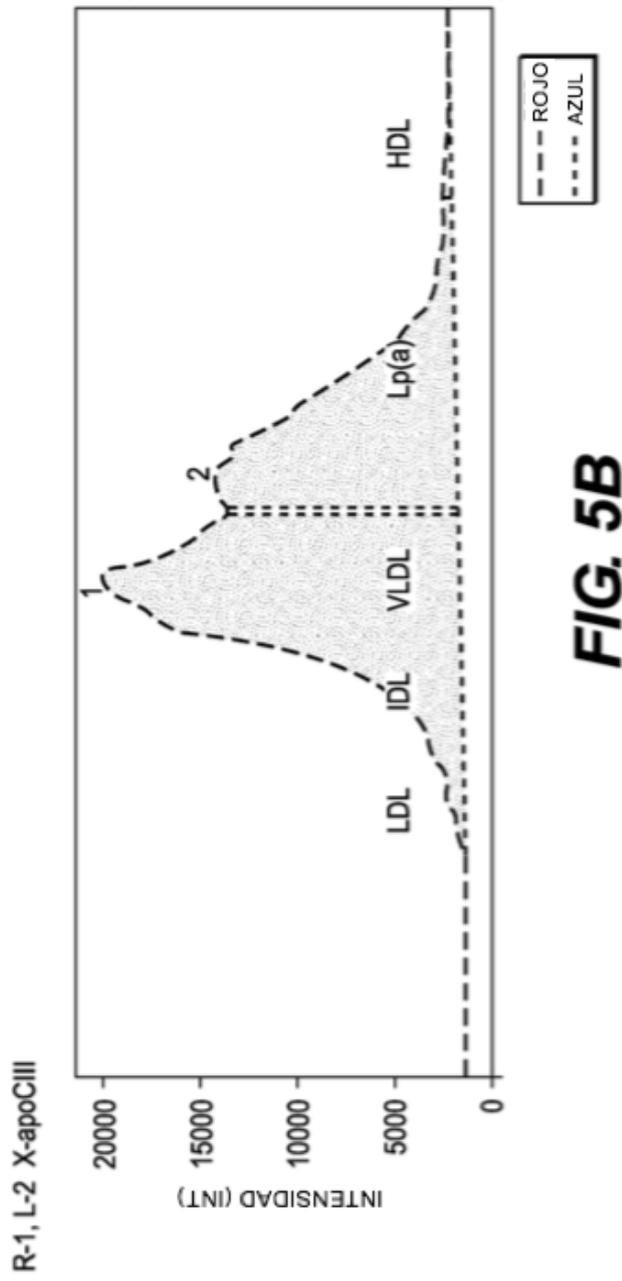


FIG. 4C





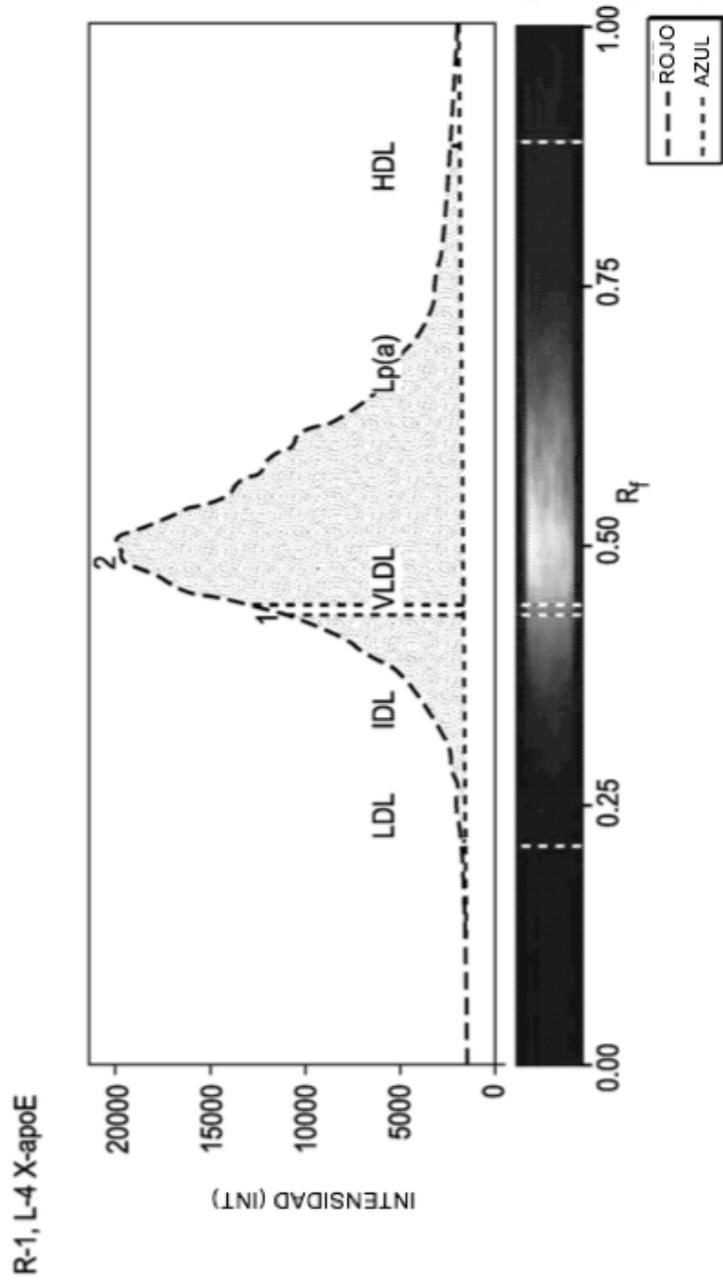


FIG. 5C

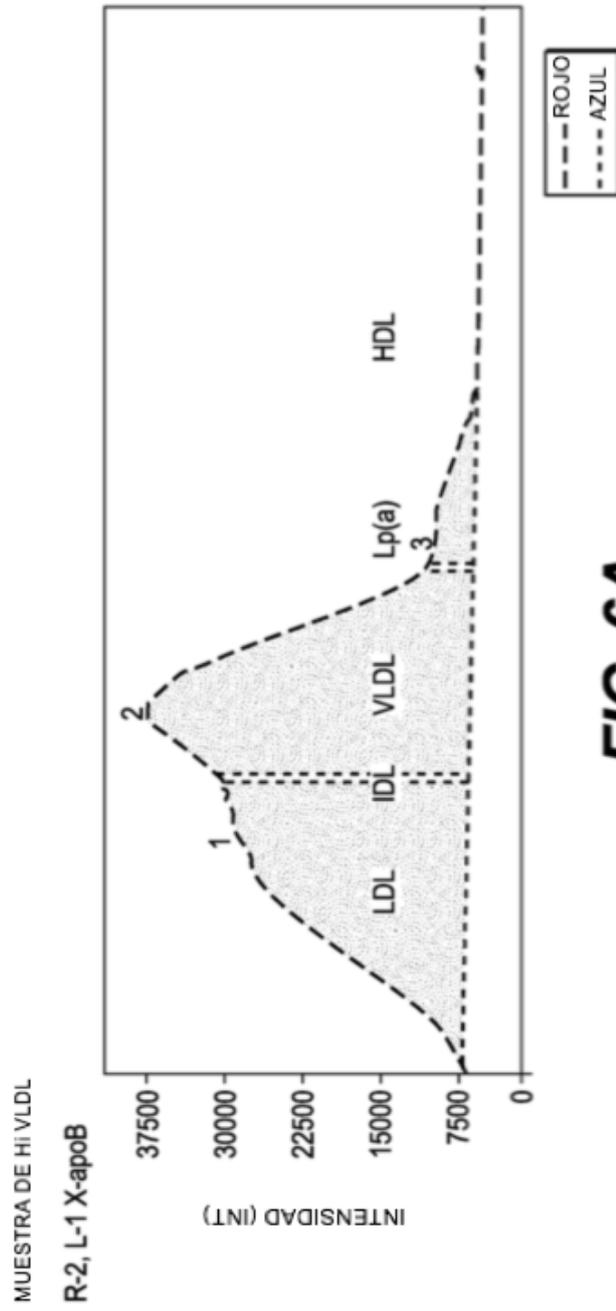


FIG. 6A

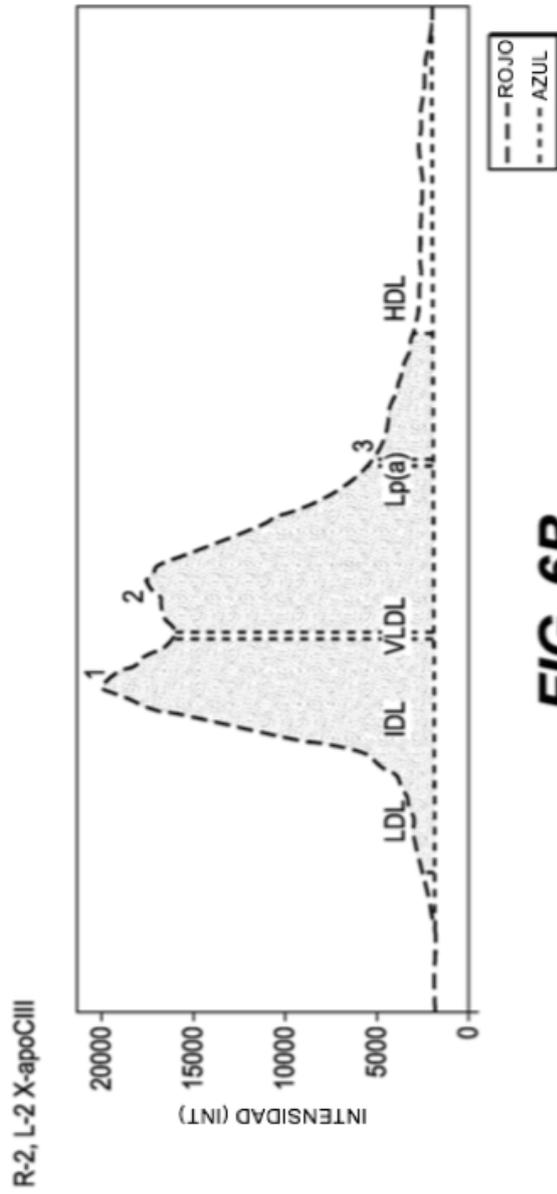


FIG. 6B

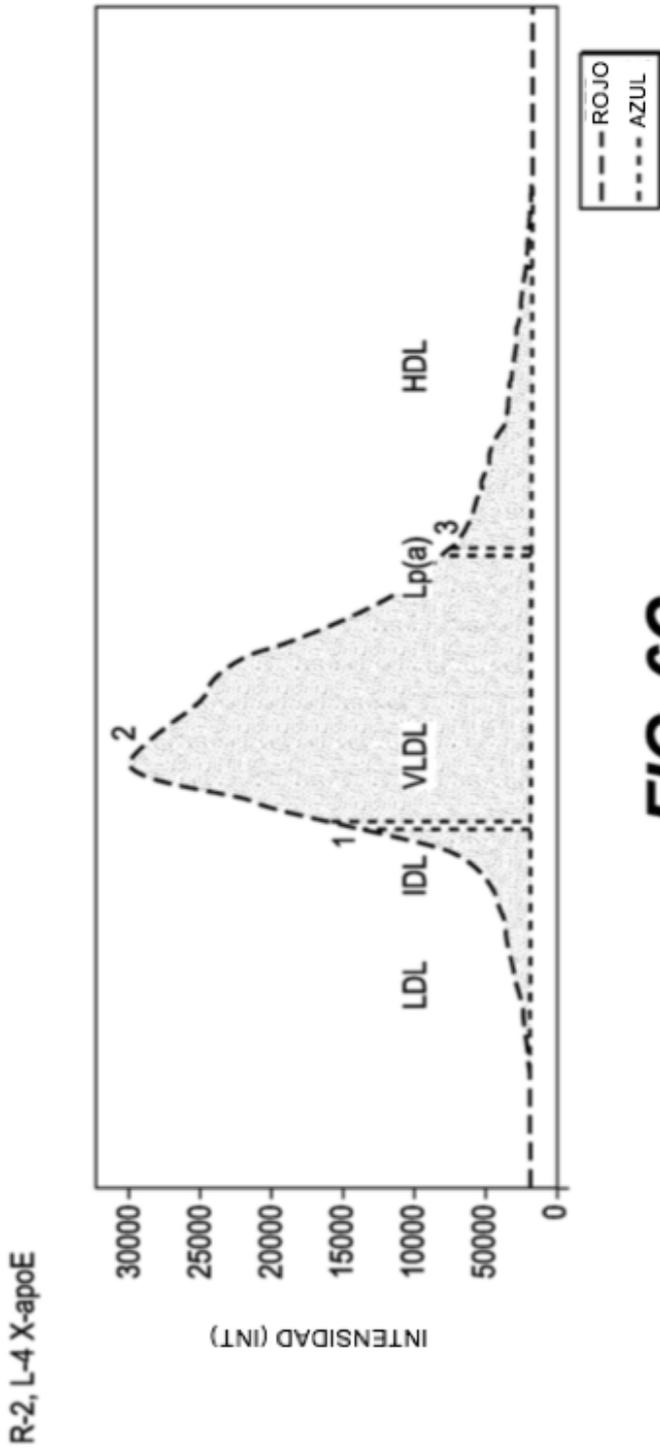


FIG. 6C

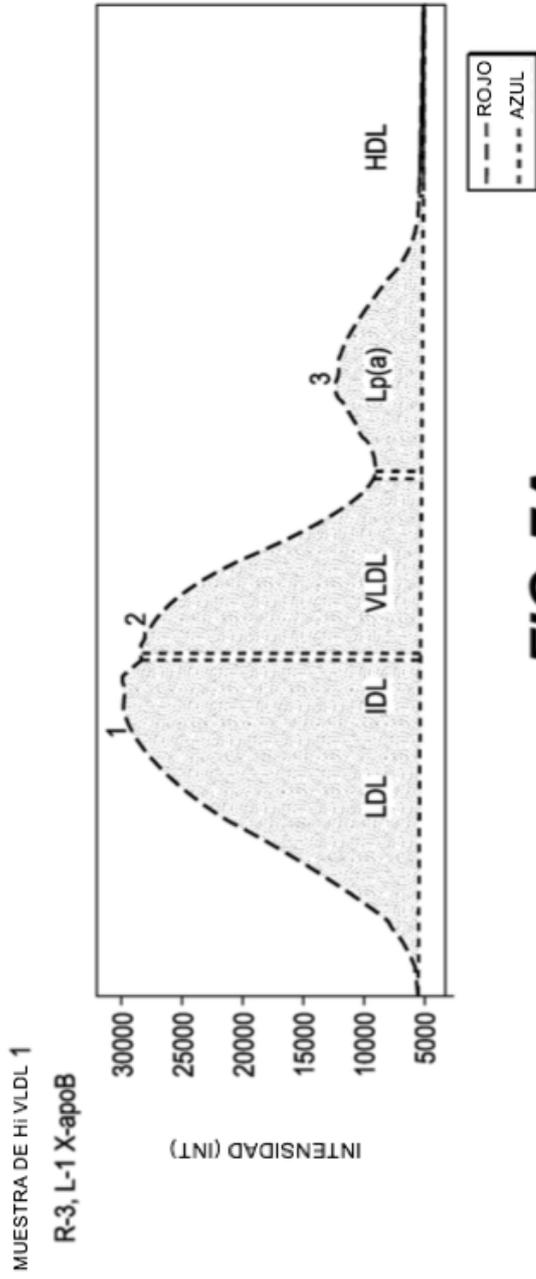


FIG. 7A

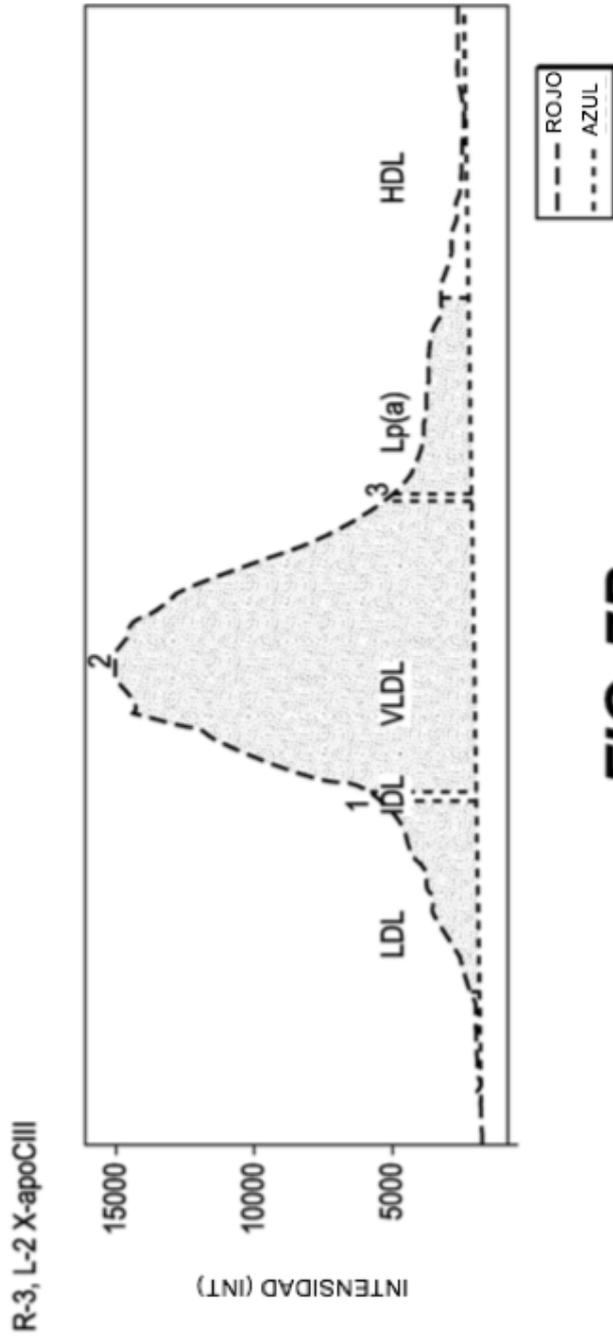


FIG. 7B

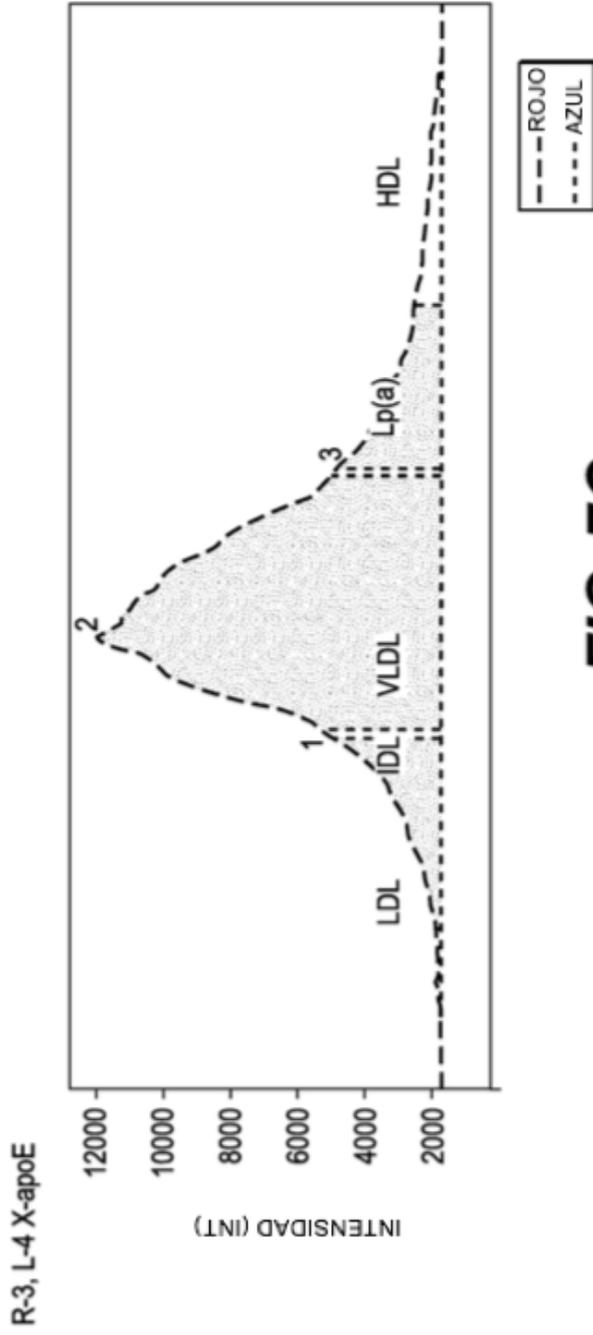


FIG. 7C

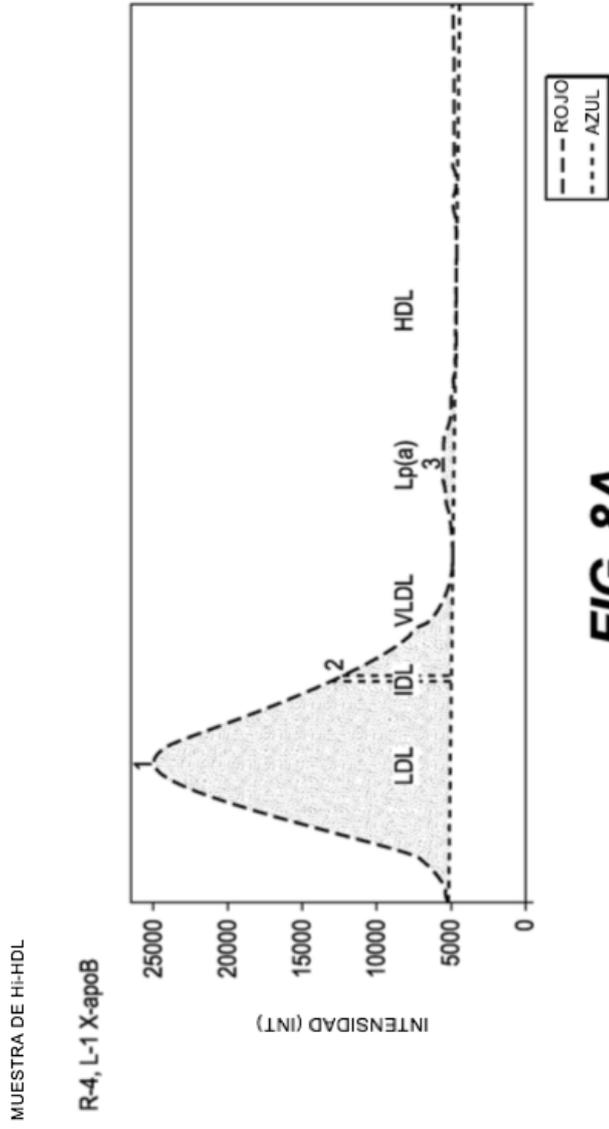


FIG. 8A

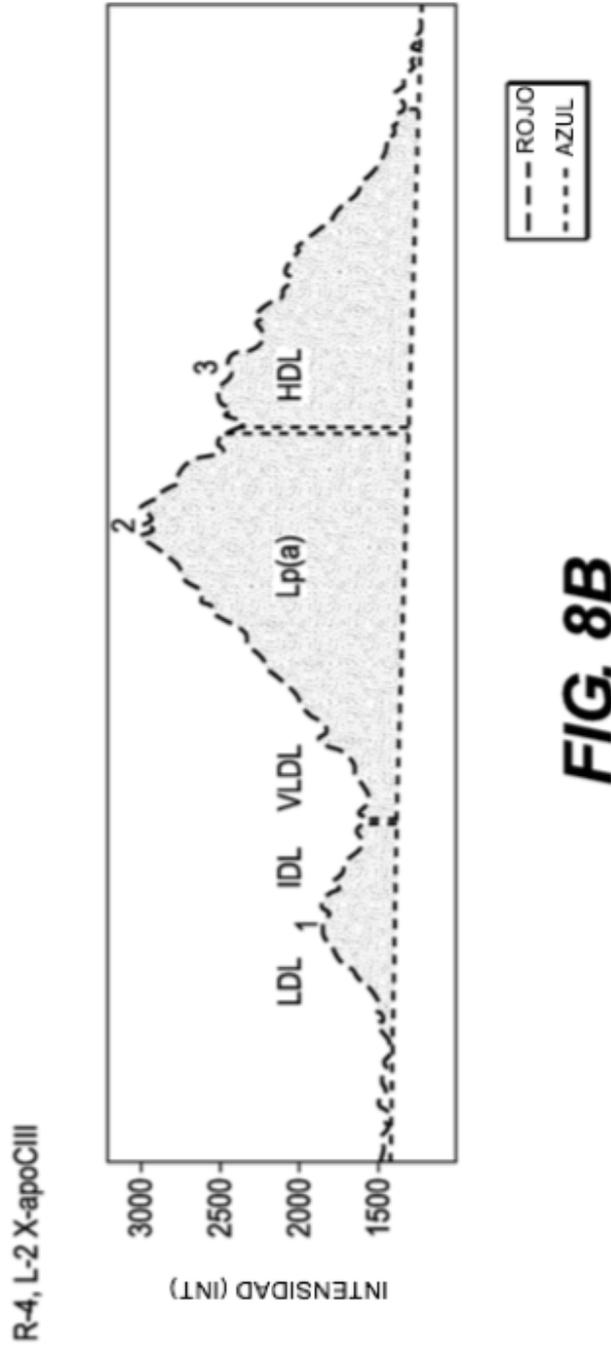


FIG. 8B

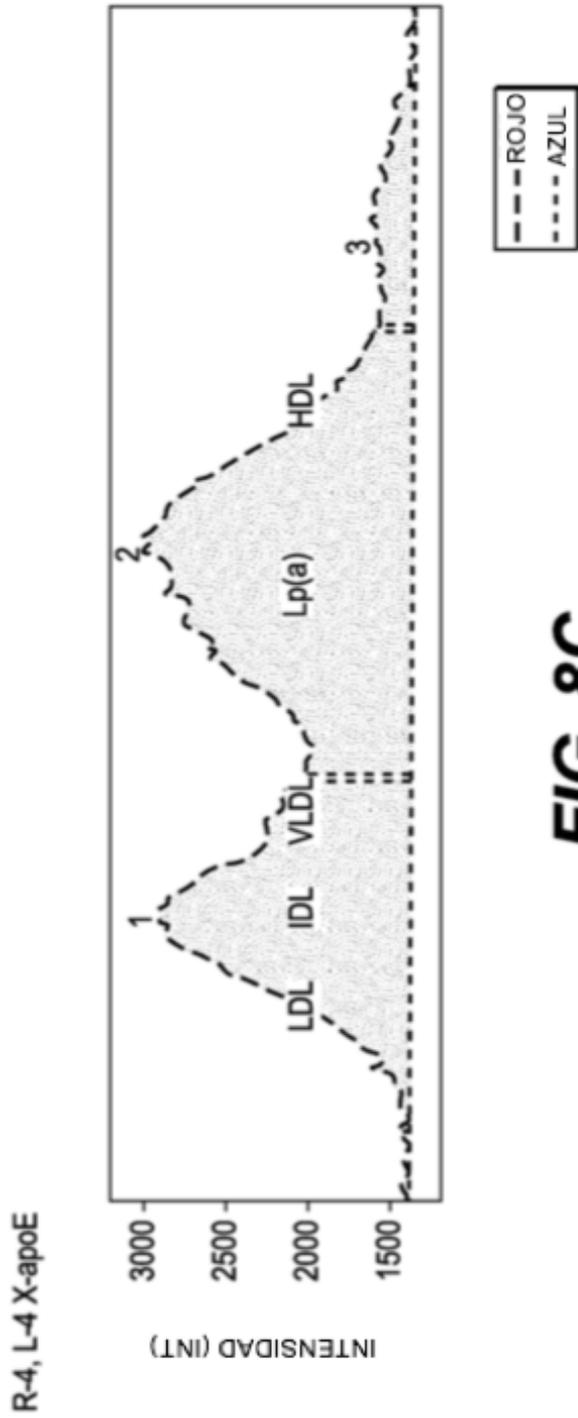


FIG. 8C

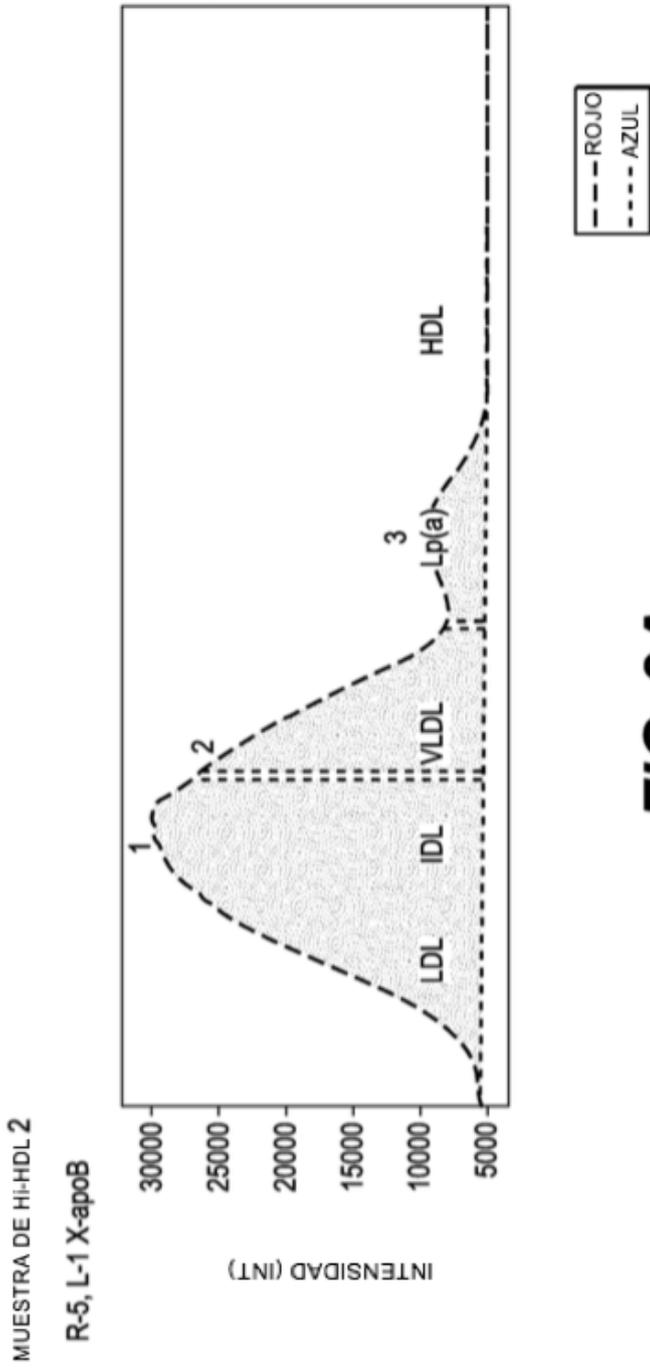
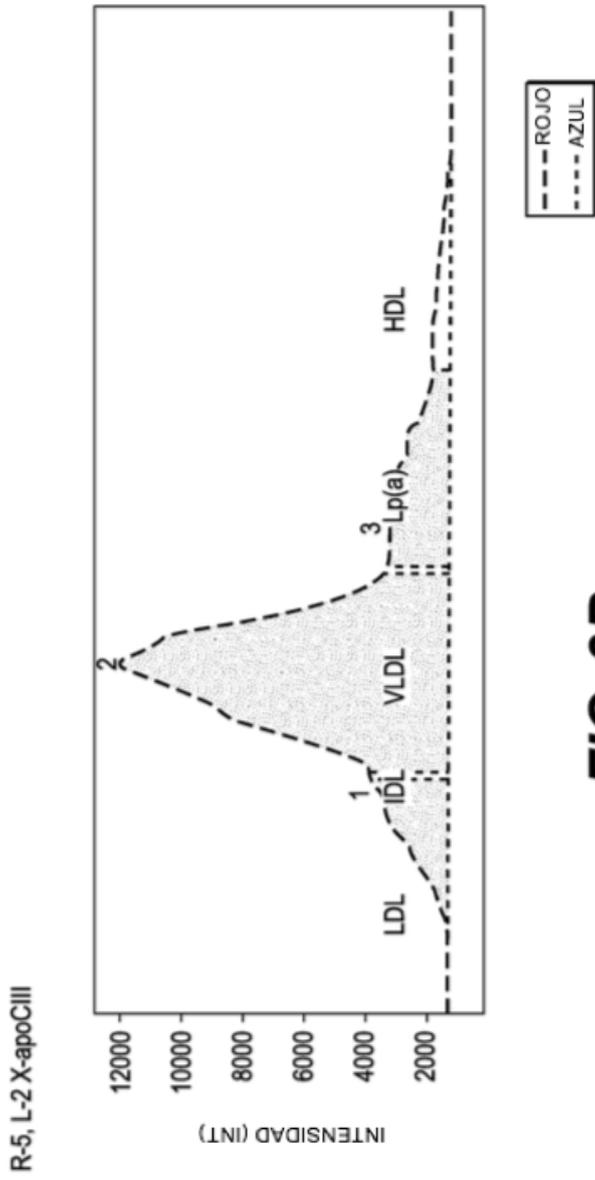


FIG. 9A



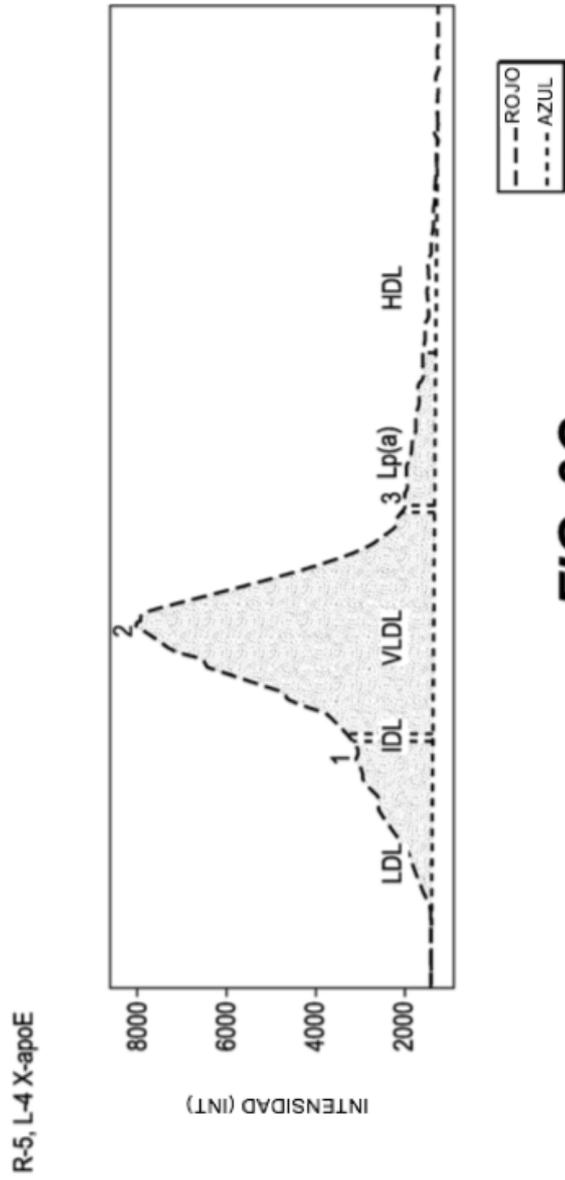


FIG. 9C

FILA 1	CARRIL 1-B	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CARRIL 2-E	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %
	CANAL						CANAL					
	ALEXA 488	1	0.262609	49006614	52.36655	52.078499						
	ALEXA 488	2	0.456522	44578986	47.63445	47.373354						
	ALEXA 546	1	0.326087	11942080	63.747072	63.505883						
	ALEXA 546	2	0.485507	6791455	36.252928	36.115753						
							ALEXA 647	1	0.471014	25306302	59.729011	59.242053
							ALEXA 647	2	0.57971	17062019	40.270699	39.942186

FIG. 10A

FILA 1	CARRIL 3-TRI	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CARRIL 4-CIII	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %
CANAL							CANAL					
ALEXA 488	1	0.311594	39086259	57.822387	57.11845							
ALEXA 488	2	0.478281	28510845	42.177615	41.664137							
ALEXA 546	1	0.376812	12387161	18.567714	18.377685		ALEXA 546	1	0.442029	6350394	18.365366	18.185202
ALEXA 546	2	0.514483	54326280	81.432286	80.598875		ALEXA 546	2	0.5	28227703	81.634634	80.8338
ALEXA 647	1	0.369565	24225994	28.70726	28.277645							
ALEXA 647	2	0.5	60163789	71.29274	70.225818							

FIG. 10B

A

FILA 2	CARRIL 3-TBL	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CARRIL 4-C II	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CARRIL
	CANAL												
ALEXA 488		1	0.227545	30845795	42.766632	42.345184							
ALEXA 488		2	0.371257	39538904	49.849124	49.33707							
ALEXA 488		3	0.538922	5310688	7.366194	7.290527							
ALEXA 546		1	0.233533	15241227	16.944228	16.826489	ALEXA 546	1	0.317365	6622682	10.386223	10.333746	
ALEXA 546		2	0.377246	70654510	78.771641	78.224187	ALEXA 546	2	0.385222	51034637	80.036629	79.632235	
ALEXA 546		3	0.556886	3853609	4.284231	4.254481	ALEXA 546	3	0.568862	6103762	9.577147	9.528758	
ALEXA 647		1	0.251497	23578975	23.515124	22.740784							
ALEXA 647		2	0.365269	71562968	71.369179	69.01903							
ALEXA 647		3	0.532334	5129587	5.115696	4.947239							

FIG. 10D

FLA 3	CARRIL 1-B	CARRIL 2-E	CARRIL %	BANDA %	VOLUMEN (INT)	FRENTE RELATIVO	BANDA %	CARRIL %	CARRIL %	BANDA %	VOLUMEN (INT)	FRENTE RELATIVO	BANDA %	CARRIL %
CARRIL 1-B	CARRIL 2-E	CARRIL %	BANDA %	VOLUMEN (INT)	FRENTE RELATIVO	BANDA %	CARRIL %	CARRIL %	BANDA %	VOLUMEN (INT)	FRENTE RELATIVO	BANDA %	CARRIL %	CARRIL %
ALEXA 488	ALEXA 488	1	0.283688	47545880	56.126375	55.998896								
ALEXA 498	ALEXA 498	2	0.390071	26055630	30.757929	30.686024								
ALEXA 498	ALEXA 498	3	0.638298	11110677	13.115795	13.086029								
ALEXA 546	ALEXA 546	1	0.283688	9251092	59.555306	59.360464								
ALEXA 546	ALEXA 546	2	0.382979	4444579	28.612851	28.519041								
ALEXA 546	ALEXA 546	3	0.631206	1837944	11.832043	11.793333								
	ALEXA 647	1	0.312057	3230674	10.726127	10.457105								
	ALEXA 647	2	0.436716	24210115	80.379268	78.358897								
	ALEXA 647	3	0.588652	2678861	3.894005	3.87045								

FIG. 10E

FILA 3		CARRIL 4-CIII		CARRIL 3-TRI		CARRIL 4-CIII		CARRIL 3-TRI		CARRIL 4-CIII		CARRIL 3-TRI					
CANAL	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CANAL	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CANAL	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %
ALEXA 488	1	0.312057	36773352	59.365178	59.076613	ALEXA 546	1	0.333333	2368852	11.224091	10.761125	ALEXA 546	1	0.333333	2368852	11.224091	10.761125
ALEXA 488	2	0.425532	13781699	22.24853	22.140363	ALEXA 546	2	0.432524	16394699	77.581341	74.477177	ALEXA 546	2	0.432524	16394699	77.581341	74.477177
ALEXA 488	3	0.666667	11389263	18.386293	18.23692	ALEXA 546	3	0.595745	2341516	11.094566	10.636944	ALEXA 546	3	0.595745	2341516	11.094566	10.636944
ALEXA 546	1	0.297872	13478055	26.202025	25.901829	ALEXA 546	1	0.333333	2368852	11.224091	10.761125	ALEXA 546	1	0.333333	2368852	11.224091	10.761125
ALEXA 546	2	0.41944	30047884	64.246769	63.510695	ALEXA 546	2	0.432524	16394699	77.581341	74.477177	ALEXA 546	2	0.432524	16394699	77.581341	74.477177
ALEXA 546	3	0.588552	4913043	9.551206	9.441778	ALEXA 546	3	0.595745	2341516	11.094566	10.636944	ALEXA 546	3	0.595745	2341516	11.094566	10.636944
ALEXA 647	1	0.326241	33781467	44.408323	44.212683	ALEXA 647	1	0.326241	33781467	44.408323	44.212683	ALEXA 647	1	0.326241	33781467	44.408323	44.212683
ALEXA 647	2	0.41944	36278892	47.65138	47.481276	ALEXA 647	2	0.41944	36278892	47.65138	47.481276	ALEXA 647	2	0.41944	36278892	47.65138	47.481276
ALEXA 647	3	0.631206	6099766	7.90297	7.665493	ALEXA 647	3	0.631206	6099766	7.90297	7.665493	ALEXA 647	3	0.631206	6099766	7.90297	7.665493

FIG. 10F

CARRIL 3-TRI		CARRIL 2-E		CARRIL 1		CARRIL 0		CARRIL -1		CARRIL -2		CARRIL -3	
FILA 4	CARRIL	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CANAL	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CARRIL %
ALEXA 488	1	1	0.173267	39927712	84.79333	84.281665							
ALEXA 488	2	2	0.267327	5700561	12.106117	12.033094							
ALEXA 488	3	3	0.509901	1459997	3.100553	3.081851							
ALEXA 546	1	1	0.183168	17563313	67.485242	67.125627	ALEXA 546	1	0.237624	3350938	36.068222	35.984919	
ALEXA 546	2	2	0.262376	3339682	12.832388	12.764007	ALEXA 546	2	0.544554	5430350	58.450222	58.315226	
ALEXA 546	3	3	0.524752	5122418	19.68237	19.577486	ALEXA 546	3	0.806931	509267	5.481556	5.468896	
ALEXA 647	1	1	0.193069	2069563	21.419606	21.051161							
ALEXA 647	2	2	0.594059	4867952	50.382431	49.515787							
ALEXA 647	3	3	0.70297	2724488	28.197963	27.712921							

FIG. 10H

FILEAS	CARRIL 1-D	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CARRIL 2-E	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %
	CANAL						CANAL					
ALEXA 488		1	0.243386	54835815	66.706576	66.461948						
ALEXA 488		2	0.328742	20353394	24.759461	24.669663						
ALEXA 488		3	0.52381	7015302	8.535962	8.502666						
ALEXA 545		1	0.222222	11416398	66.241627	65.757707						
ALEXA 545		2	0.296296	4488099	25.928834	25.739414						
ALEXA 545		3	0.502546	1349380	7.829538	7.772341						
							ALEXA 647	1	0.222222	2644285	11.342526	10.603865
							ALEXA 647	2	0.344497	16790066	72.070026	68.558314
							ALEXA 647	3	0.457354	30766897	16.637448	16.530204

FIG. 10I

FILA \$	CARRIL S. III CANAL	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CARRIL 4. CH CANAL	Nº BANDA	FRENTE RELATIVO	VOLUMEN (INT)	BANDA %	CARRIL %	CARRIL S. III CANAL
	ALEXA 488		0.248877	36760153	85.41194	64.034728							
	ALEXA 488		0.333333	3086241	23.143632	22.888644							
	ALEXA 488		0.514392	6431531	11.444228	11.338447							
	ALEXA 546	1	0.296349	19882049	38.90111	38.513883	ALEXA 546	1	0.238395	2324029	15.266812	14.827332	
	ALEXA 546	2	0.312169	27963254	54.712752	54.187824	ALEXA 546	2	0.378661	11749254	17.263304	14.960587	
	ALEXA 546	3	0.455226	3263905	6.388138	6.322534	ALEXA 546	3	0.518519	1128553	7.428883	7.208579	
	ALEXA 647	1	0.76455	38091510	55.353852	53.788502							
	ALEXA 647	2	0.338624	25118878	36.488006	35.473217							
	ALEXA 647	3	0.502646	5039173	8.151143	7.922256							

FIG. 10J